

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

Direktor: Prof. Dr. L. Felix Müller

DIE ISOZITRONENSÄUREDEHYDROGENASE
(ICD)
IM SERUM
KLINISCH GESUNDER HUNDE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Axel Block
Tierarzt aus Pretzsch
Berlin 1965

Journal-Nr.: 497



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550805_0055

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität
Berlin

Direktor: Prof. Dr. L. Felix Müller

DIE ISOZITRONENSÄUREDEHYDROGENASE
(ICD)
IM SERUM
KLINISCH GESUNDER HUNDE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Axel Block
Tierarzt aus Pretzsch
Berlin 1965

Journal-Nr.: 497

Gedruckt mit der Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Priv. Doz. Dr. E. Lettow
Korreferent: Prof. Dr. H. J. Heidrich



Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1965

Tag der Promotion: 1.6.1965

G l i e d e r u n g

	<u>Seite</u>
Einleitung	1
I. Die Isozitroneisäuredehydrogenase (ICD)	2
1. Die Verteilung der ICD im Organismus	2
2. Die Lokalisation der ICD in der Zelle und ihre Rolle im Stoffwechsel	4
3. Die Bedingungen für die ICD-kataly- sierte Reaktion	9
4. Der physiologisch und pathologisch be- dingte Austritt von ICD aus der Zelle	12
5. Die Elimination der ICD im extrazellu- lären Raum	13
6. Die Normalwerte der ICD beim Menschen	14
7. Die Serum-ICD-Aktivitäten bei ver- schiedenen Erkrankungen des Menschen	15
8. Die ICD in der Veterinärmedizin	18
II. Eigene Untersuchungen	19
1. Material und Methode	19
2. Voruntersuchungen	31
a. Bestimmung des methodischen Fehlers	32
b. Bestimmung der Haltbarkeit des Fermentes im Serum	33
c. Bestimmung der individuellen Serum- fermentaktivität über einen und mehrere Tage	36
d. Einfluß der Nahrungsaufnahme	38
3. Die Bestimmung der ICD im Serum klinisch gesunder Hunde	42
III. Diskussion	53
IV. Zusammenfassung	57
V. Literaturverzeichnis	59

Einleitung

Untersuchungen von Enzymaktivitäten haben seit langem ihren gesicherten Platz in der klinischen Diagnostik. Ausgehend von der Beobachtung Warburgs (1943), daß im Serum auch Enzyme des Gewebsstoffwechsels auftreten, wurden diese Bestimmungen besonders in den letzten Jahren stark ausgebaut. Es fand auch der Nachweis der Serumisozitronensäuredehydrogenase (SICD) Eingang in die klinische Diagnostik der Humanmedizin. In der Veterinärmedizin wurde diesem Ferment bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die Aktivitäten der Isozitronensäuredehydrogenase im Serum klinisch gesunderscheinender Hunde zu bestimmen.

I. Die Isozitrone Säuredehydrogenase (ICD)

1. Die Verteilung der ICD im Organismus

ICD (Abkürzungen siehe unten) ist ein an die Zellen gebundenes Ferment des Zitronensäurezyklus, das in allen Organen und auch Körperflüssigkeiten wie Blut, Lymphe, Liquor cerebrospinalis und interstitielle Flüssigkeit mehr oder weniger enthalten ist (3, 14). Aus den beiden folgenden Tabellen (Abb. 1), die die Enzymmuster menschlicher Gewebe veranschaulichen, kann man unter anderem auch die ICD-Aktivitäten der verschiedenen Organe quantitativ ablesen und mit den Aktivitäten anderer Fermente vergleichen. So finden wir z. B. recht hohe ICD-Aktivitäten in Leber, Niere, Magenmucosa, Fettgewebe und im Herzmuskel. Daneben ist, was aus der Tabelle nicht hervorgeht, die Placenta ebenfalls reich an ICD (9).

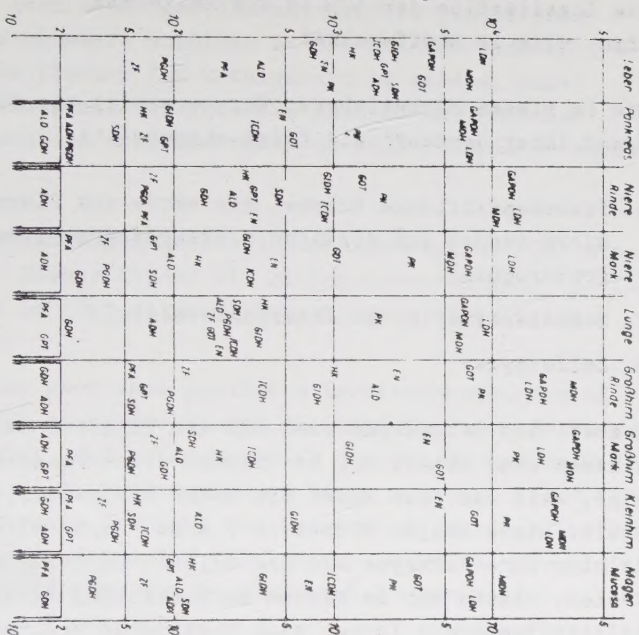
Der Spiegel aller Dehydrogenasen ist, wie Versuche mit Ratten ergeben haben, während der Laktation in den Mamdrüsen erhöht. Lediglich die ICD-Werte bleiben im Normalbereich (4).

Die zellulären Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten enthalten in ihrer enzymatischen Ausstattung ebenfalls ICD. (21)

Es wurden folgende Abkürzungen benutzt:

ICD oder IDH	- Isozitrone Säuredehydrogenase
DPN	- Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	- reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
TPN	- Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	- reduziertes Triphosphopyridinnucleotid
GOT	- Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	- Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LDH	- Lactatdehydrogenase
MDH	- Malatdehydrogenase

Enzymaktivitäten in Böcher-Einheiten ^a/100 mg Extrakt-Protein



Enzymaktivitäten in Böcher-Einheiten ^a/100 mg Extrakt-Protein

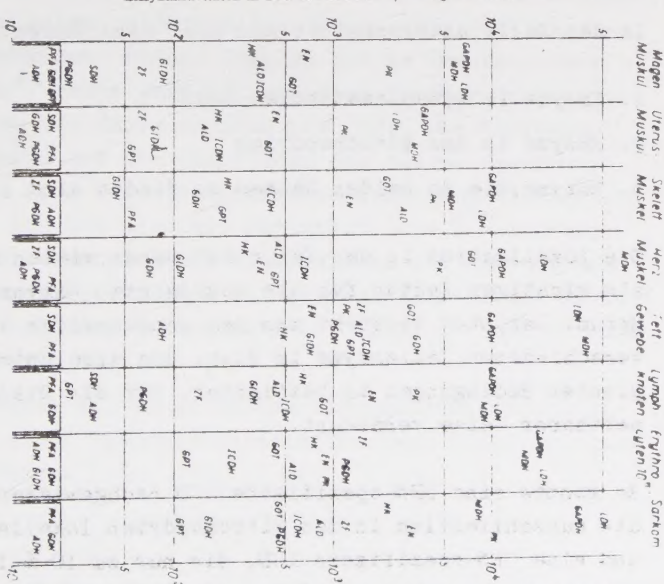


Abb. 1 Enzymmuster menschlicher Gewebe

[Schmidt, E. u. Schmidt, F. W.
zit. bei Bergmeyer (3)]

2. Die Lokalisation der ICD in der Zelle und ihre Rolle im Stoffwechsel

Die im Plasma nachweisbaren Enzyme werden von Bücher auf Grund ihrer Herkunft wie folgt eingeteilt:

1. Plasmaspezifische Enzyme, die aktiv ins Plasma sezerniert werden und dort ihre Wirkungsstätte finden (z. B. Prothrombin).
2. Sekretenzyme (z. B. Pankreasfermente).
3. Zellenzyme.

Sekret- und Zellenzyme sind für die Funktion des Blutplasmas ohne Bedeutung. Man findet diese Fermente lediglich hier, weil das Blut Räume mit hoher Enzymaktivität umspült. Diese Enzyme können im Plasma nicht wirksam werden, da hier ihre Koenzyme und die meisten ihrer Substrate fehlen. Manche der im Plasma nachweisbaren Fermente des Zellstoffwechsels lassen sich bestimmten Organen zuordnen, und man kann mit ihrer Hilfe Rückschlüsse auf den Zustand dieser Organe ziehen (3).

In der Zelle unterscheidet man grob drei Enzymtypen:

1. Enzyme im zytoplasmatischen Raum
2. Enzyme in den Mitochondrien
3. Enzyme, die in beiden Räumen zu finden sind (3, 30)

Die Lokalisation in der Zelle ist neben vielen anderen ein wichtiger Faktor für die sogenannten Enzymmuster im Serum. Darunter versteht man das mengenmäßige Verhältnis verschiedener Zellenzyme im Blut, das sich unter pathologischen Bedingungen in bestimmter, für die Diagnostik auswertbarer Weise verändert.

Es konnte eine DPN-spezifische ICD nachgewiesen werden, die ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist, und eine TPN-spezifische ICD, die nur zu 10 % in den Mitochondrien und zu 90 % in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas gelagert ist.

Die in den Lebermitochondrien ablaufenden Oxydationen von Isozitronensäure scheinen zu $3/4$ von DPN- und zu $1/4$ von TPN-spezifischer ICD katalysiert zu werden, wobei TPNH und DPNH gebildet wird, die dann durch TPNH- und DPNH-Oxydasen und Transhydrogenasen wieder oxydiert werden. (12).

Die ICD ist dem sogenannten Zitronensäurezyklus (39) eingeschaltet. Dieser findet als biologischer Vorgang in allen Geweben und in fast allen Mikroorganismen statt (siehe Abb. 2).

Die durch die Aконitase gebildete Isozitronensäure wird durch die ICD so oxydiert, daß sie zwei Wasserstoffatome dem TPN abgibt, das seinerseits an die Dehydrogenase gebunden ist; d. h. Untersuchungen haben gezeigt, daß die ICD dabei die direkte Übergabe von Wasserstoff von der Isozitronensäure auf das TPN katalysiert, wobei wahrscheinlich der Wasserstoff eher vom α - als vom β -Kohlenstoff der Isozitronensäure stammt (11).

Infolge dieser Reaktion entsteht reduziertes Triphosphopyridinnucleotid (TPNH) und Oxalbernsteinsäure (Oxalsuccinat), die wahrscheinlich in Form eines ICD-Oxalbernsteinsäure-Komplexes vorkommt. Dieser Komplex ist in Gegenwart von Mn^{++} oder Mg^{++} recht instabil und wird rascher decarboxyliert, als es die Säure spontan tut (32). Die Oxalbernsteinsäure wird auf der Oberfläche des Enzyms decarboxyliert, wobei sich α -Ketoglutar Säure unter CO_2 -Entwicklung bildet. Die ICD hat also die Fähigkeit, die Isozitronensäure zu Oxalbernsteinsäure zu oxydieren und anschließend diese zu α -Ketoglutar Säure zu decarboxylieren. Der gleiche Reaktionsablauf unter Einwirkung der ICD ist auch in umgekehrter Richtung möglich.

Man kann demnach von einer Oxalsuccinataciddecarboxylase- (OSADC) und einer Oxalsuccinatacidreductase (OSAR)-Wirkung der ICD sprechen.

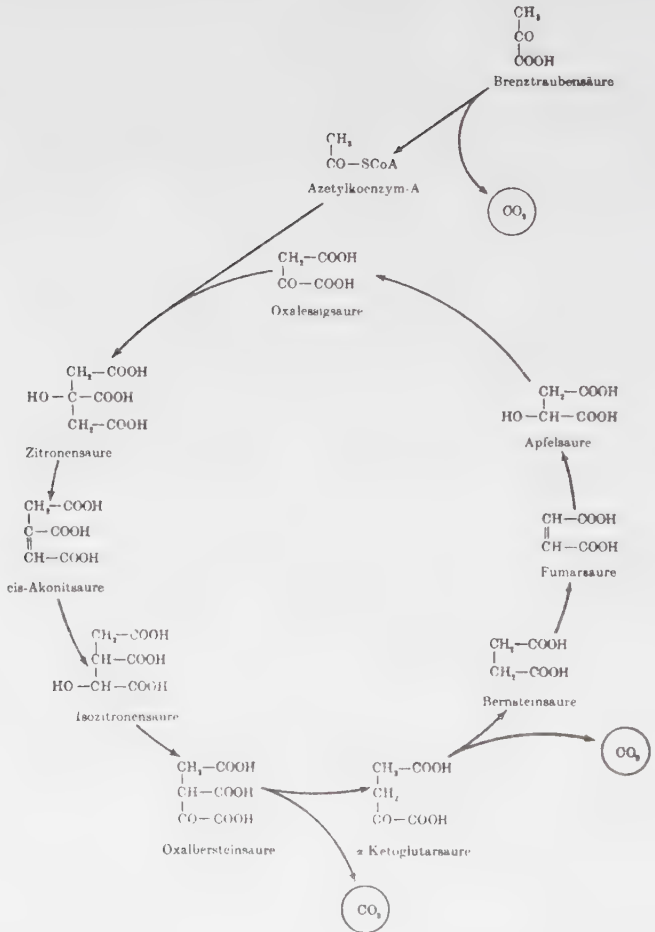


Abb. 2 Skizze des Zitratzyklus
(Straub, F. B. Biochemie (39))

Die Oxalbernsteinsäure, die durch die ICD aus Isozitronensäure gebildet wird, kann nicht angehäuft werden.

Das Oxalsuccinat scheint nämlich kein freies Zwischenprodukt der ICD-katalysierten Reaktion zu sein, vielmehr ist wohl der schon oben erwähnte ICD-Oxalbernsteinsäure-Komplex als freie Zwischenverbindung dieser Reaktion anzusehen, der mit der freien Oxalbernsteinsäure im Gleichgewicht steht. Dieses Gleichgewicht ist aber gemäß folgender Gleichung sehr stark nach rechts verschoben (32).



Man kann vermuten, daß sowohl Isozitronensäure als auch Oxalbernsteinsäure an die gleiche Stelle des Enzyms gebunden ist, und daß dementsprechend dieser Substrat-Enzym-Komplex oxydiert, reduziert und decarboxyliert werden kann. Mit dieser Annahme könnte man auch folgendes experimentell gefundenes Ergebnis erklären:

Durch Isozitronensäureüberschuß, nicht aber durch andere Tricarbonsäuren, kann die Decarboxylierung von Oxalbernsteinsäure gehemmt werden, was sicherlich durch kompetitive Substrathemmung bedingt ist.

Die geschilderte Oxydation von Isozitronensäure zu α -Ketoglutarensäure findet in folgenden Reaktionsstufen statt (45, 25, 32, 35):

1. Isozitatrat + TPN $\xrightleftharpoons{\text{ICD}}$ Oxalbernsteinsäure + TPNH + H^+
2. Oxalbernsteinsäure + ICD $\rightleftharpoons$ ICD-Oxalbernsteinsäure-Komplex
3. ICD-Oxalbernsteinsäure-Komplex $\xrightleftharpoons{\text{Mn}^{++}}$ α -Ketoglutarensäure + CO_2

Die Umkehrung der Reaktion kann man sich so vorstellen, daß am β -Kohlenstoff der α -Ketoglutarensäure Wasserstoff abdissoziiert wird, der durch die ICD substituiert wird.

Dabei kann sich ein Enzym-Enolat-Komplex bilden, der sowohl weiterhin mit CO_2 reagieren und einen Bernstein-säure-ICD-Komplex bilden kann, aus dem sich weiter Iso-zitronensäure bildet. Umgekehrt kann er durch Erwerb eines freien Wasserstoffions aus dem umgebenden Medium zu α -Ketoglutarsäure und Enzym gespalten werden.

Bei der Oxydation der Isozitronensäure zu α -Ketoglutar-säure bildet sich wahrscheinlich aus dem Enzym-Oxalbern-steinsäure-Komplex ein Enzym- α -Ketoglutarsäure-Komplex, der aber rasch umgewandelt wird und sich mit den Wasser-stoffionen des umgebenden Mediums zur stabilen, freien Ketoverbindung und Enzym umbildet.

Mit anderen Worten heißt es, daß das unmittelbare Produkt der oxydativen Decarboxylierung von Isozitronensäure das enzymgebundene Enolat der α -Ketoglutarsäure ist, das sich aber rasch in die stabile, freie Ketoverbindung um-wandelt (32).

Die α -Ketoglutarsäure ist abgesehen von ihrer Rolle im Zitronensäurezyklus eine sehr wichtige Substanz, da die verschiedenen Aminogruppen auf dem Wege der Transaminierung ihre Aminogruppen an die α -Ketoglutarsäure abgeben, die dadurch zu Glutaminsäure umgeformt wird (11, 35, 39).

Wie schon erwähnt, gibt es in der Zelle eine TPN-spezifische und eine DPN-spezifische ICD, wobei die TPN-spezifische vornehmlich in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas nach-gewiesen wurde, während die DPN-spezifische ICD in den Mitochondrien gelagert ist.

Diese Tatsache ist schlecht damit in Einklang zu bringen, daß sich der Zitronensäurezyklus nur in den Mitochondrien abspielen soll. Die Isozitronensäureversorgung der extra-mitochondralen ICD-Reaktion scheint nicht durch intra-mitochondral gebildetes Isozitatrat oder Zitatrat zu erfolgen, sondern durch Zitatratvorstufen im Zytoplasma, die wahr-scheinlich von extramitochondral gelegenen Enzymen des Zitronensäurezyklus aus Acetat und Oxalacetat gebildet werden. Die Umwandlung von Acetat zu α -Ketoglutarsäure fin-det also auch extramitochondral statt. Die Oxydation von Fettsäuren und Brenztraubensäure in den Mitochondrien führt

zu Acetyl-CoA. Der Acetylrest kann durch den mitochondrialen Zitronensäurezyklus oxydiert werden, er kann allerdings auch extramitochondrial verstreut sein und durch dort liegende Fermente des Zitronensäurezyklus in α -Ketoglutarinsäure umgebildet oder zur Synthese von Fetten oder Steroiden verwendet werden.

Da die intramitochondrial gelegenen Enzyme nur bei Schädigung der Mitochondrien in Freiheit gesetzt werden sollen, ist es unwahrscheinlich, daß die extramitochondrialen Enzyme ihren Ursprung in den Mitochondrien haben (22).

Auch von der ICD ist bekannt, daß einige Enzymformen mit gleicher Reaktionsform, aber mit unterschiedlicher Molekularstruktur in einem Organismus und sogar in ein und demselben Gewebe vorkommen.

Sie werden als Isozyme bezeichnet. (23).

3. Die Bedingungen für die ICD-katalysierte Reaktion

Enzymkatalysierte Reaktionen sind wie alle chemischen Reaktionen temperaturempfindlich. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt 10 % pro Grad und mehr. Das heißt Temperaturerhöhungen um 10° C bedeuten eine Zunahme der Enzymaktivität um 100 % und mehr.

Wolfson und Williams-Ashman (45) geben für den Temperaturbereich zwischen 20° und 30° C einen Temperaturkoeffizienten von 1,7 an, der jedoch von Bell und Baron (2) korrigiert und für den gleichen Temperaturbereich auf 3,2 festgelegt wurde.

Alle Enzyme haben einen optimalen pH-Bereich ihrer Wirksamkeit, der häufig sehr schmal ist. Für ICD beträgt das pH-Optimum 7,4 (3); es liegt also im normalen pH-Schwankungsbereich des Blutes (pH 7,3 - 7,5). Dieser Wert wird durch die Pufferfunktion des Blutes aufrechterhalten, wodurch pH-Schwankungen, die die Enzymreaktionen beeinflussen können, unterbleiben. Aus diesem Grund sind auch beim Nachweis der ICD im Serum zur Konstanthaltung eines

bestimmten pH-Wertes Pufferzusätze unerlässlich.

Divalente Kationen sind für die ICD-katalysierte Reaktion unbedingt wichtig. So sind es besonders Mn^{++} und Mg^{++} , aber auch andere wie Co- und Ni-Ionen, die die Reaktion maßgeblich mitbeeinflussen können. So wird beispielsweise die Decarboxylierung der Oxalbernsteinsäure bzw. des ICD-Bernsteinsäure-Komplexes durch Mn-Ionen stark beschleunigt, dagegen scheint die Reaktion:



auch ohne Mn-Ionen stattzufinden (25). Die größte Wirksamkeit haben, wie Versuche ergaben, Mn-Ionen, dann folgen mit abnehmender Wirksamkeit Co-, Mg-, Ni-Ionen. Dabei können beispielsweise Mg-Ionen Mn-Ionen erst in 10fachem Überschuß ersetzen (45).

Nachdem es gelang, ICD aus der Kamtermuskulatur von Schweine- und Rinderherzen rein darzustellen (36), konnte man sich über die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieses Enzyms mehr Aufschluß verschaffen. Daß es sogar gelang, ICD in kristallisierter Form zu gewinnen, spricht für den Reinheitsgrad des Produktes (3).

So beträgt das Molekulargewicht ca. 61000, der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 7,4; die Gleichgewichtskonstante bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von 22° C hat den Wert:

$$K' = \frac{(\text{L-Isozitronensäure}) (\text{TPN})}{(\alpha\text{-Ketoglutarsäure}) (\text{CO}_2) (\text{TPNH})} = 1,31/\text{Mol}$$

Die Michaeliskonstante beträgt $2,6 \cdot 10^{-6}$ für L₅-Isozitronensäure bei einem pH-Wert von 7,3 und einer Temperatur von 24° C.

Im pH-Bereich von 5,6 - 8,5 hat ICD eine geringe elektrophoretische Beweglichkeit.

Trockenpräparate sind bei 0 - 4° C mehrere Monate lang haltbar, ebenso Suspensionen in 3molarer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung mit einem pH-Wert von ca. 6,0.

Folgende Anforderungen werden an den Reinheitsgrad gestellt: Ein universell verwendbares ICD-Präparat soll ca. 3 Einheiten / mg enthalten. Fremdaktivitäten je 0,2 % Aconitase und DPN-spezifische ICD (3).

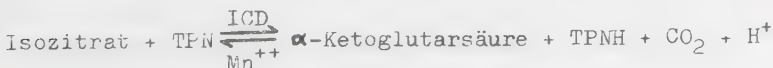
Die optimale Mn^{++} -Konzentration beträgt 5×10^{-4} Mol, eine $1,3 \times 10^{-3}$ molare Konzentration von Mg^{++} aktiviert mit gleichem Effekt.

Parachlormercuribenzoat hemmt dagegen die Reaktion. Eine 50 %ige Hemmung tritt bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-8}$ Mol ein, eine völlige bei 1×10^{-5} Mol. Schwermetallionen sind schon in Spuren Inhibitoren. Kleinste Mengen von Cu- bzw. Hg-Verbindungen können total inaktivieren. Monothiole dagegen können reaktivieren. Auch durch einen Überschuss an Isozitronensäure kann die Decarboxylierung von Oxalbernsteinsäure gehemmt werden (3).

Die ICD ist auch empfindlich für Alkohol über -6° C (36).

Die durch ICD-katalysierten Reaktionen sind an das Vorhandensein von Pyridinnucleotiden als Koenzyme gebunden, die in oxydierter Form als Wasserstoffakzeptoren und in reduzierter Form als Wasserstoffdonatoren fungieren.

Eine große Bedeutung kommt der TPN-spezifischen ICD zu, da ihr Anteil im Serum gegenüber dem der DPN-spezifischen überwiegt. In der Zelle findet die Austauschreaktion zwischen α -Ketoglutar Säure und Enzym nicht statt, wenn TPNH und Mg- oder Mn-Ionen fehlen. Wahrscheinlich ist TPNH für die Wasserstoffaktivierung und die Carboxylierung von α -Ketoglutar Säure notwendig.



Die genaue Rolle des TPNH bei der Austauschreaktion ist nicht geklärt, doch liegt die Vermutung nahe, daß TPNH

das ICD-Protein strukturell so orientiert, daß die Wechselwirkung zwischen aktivem Zentrum und der α -Ketoglutar säure optimal wird. Das gebildete TPNH wird teilweise durch TPNH-Oxydase und teilweise durch Transhydrogenase oxydiert. Diese Oxydation scheint sowohl in den Mitochondrien als auch im Plasma stattzufinden (12, 22).

Beim Nachweis, wo neben Serum-ICD und der Isozitronensäure auch TPN hinzugefügt werden muß, bietet sich nun diese substratbedingte TPNH-Bildung an, um mit ihrer Hilfe die Fermentaktivität zu bestimmen. Warburg und Christian (40) haben nämlich festgestellt, daß TPN und auch DPN bei einer Wellenlänge von $340\text{m}\mu$ ein Minimum, TPNH und DPNH dagegen ein Maximum der optischen Dichte haben. So kann man auf Grund der Extinktionszunahmen und mit Hilfe der Definition der Enzymeinheit auf die Fermentmenge im Serum schließen.

4. Der physiologisch und pathologisch bedingte Austritt von ICD aus der Zelle

Für den Austritt der ICD aus der Zelle unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen scheinen nach den bisher vorliegenden Untersuchungen prinzipiell die gleichen Bedingungen vorzuliegen, wie sie auch für andere in der klinischen Diagnostik nachgewiesene Serumfermente gelten.

Unter normalen Verhältnissen scheinen die Zellwände für die Fermente teilweise durchlässig zu sein, wodurch der normale Serumfermentspiegel erklärt werden kann.

Unter pathologischen Verhältnissen erfolgt ein Enzymaustritt durch Schädigung von Organzellen, was auch tierexperimentell nachgewiesen wurde. Das Ausmaß der Schädigung, daß Voraussetzung für einen gesteigerten Enzymaustritt aus der Zelle ist, wird unterschiedlich beurteilt. Beim Zelltod (Nekrose) fließen die Fermente wahrscheinlich auf Grund des Konzentrationsgefälles in den extrazellulären Raum

und führen somit zu erhöhten Plasmawerten. Viele Befunde weisen darauf hin, daß auch schon geringe, morphologisch nicht unbedingt erfaßbare Zellschäden von einem Enzymanstieg begleitet werden. Ob nun dabei eine krankheitsbedingte Steigerung der spezifischen Zelleistung vorliegt, die sich in einer vermehrten Enzymproduktion ausdrückt, oder ob die Zellwand oder die Membran der Mitochondrien durch die Noxe für die Enzyme durchlässiger wird, ist noch weitgehend ungeklärt (1, 3, 17, 18, 28, 30, 42). Für eine wesentliche Erhöhung der Serumaktivität der ICD sind Art, Ausmaß und Geschwindigkeit der Zellschädigung von Bedeutung. So erklären sich z. B. die hohen ICD-Aktivitäten bei der akuten Hepatitis und die normalen ICD-Werte bei der Zirrhose des Menschen.

. Die Elimination der ICD im extrazellulären Raum

Es ist bisher unbekannt, welche Vorgänge an der ICD-Elimination aus dem Plasma beteiligt sind. Folgende Möglichkeiten müssen in Erwägung gezogen werden:

1. Intra- und extravasaler Abbau bzw. Inaktivierung der Fermente.
2. Wiederaufnahme des Fermentproteins in aktiver Form durch die Zellen.
3. Elimination der Fermente in aktiver Form durch Leber und Niere.

Die Niere und die Leber kommen für die Elimination auf Grund von Versuchen nicht in Frage (37).

Ein Molekulargewicht von 68000 stellt für die Niere die Passageschwelle für Eiweißkörper dar. Trotz seines Molekulargewichtes von ca. 61000 wird aber ICD nicht durch die Niere ausgeschieden. Auch eine Elimination über die Galle

scheint nicht oder nur geringgradig stattzufinden.

Beim Freiwerden von Enzymen aus der Zelle erfolgt eine Einstellung des Abflußgleichgewichtes, das in zwei Phasen erfolgt. Dabei kommt es in der ersten Phase zu einer raschen Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes; in der zweiten Phase erfolgt dann eine bei den verschiedenen Fermenten unterschiedlich schnelle Elimination (1, 3).

Über die Eliminationsgeschwindigkeit der ICD liegen bisher nur folgende Untersuchungen vor:

Die bei Ratten mittels reiner ICD experimentell ermittelten Halbwertszeiten betragen 60 Minuten (44). Beim Hund wird der Serum-ICD-Normalspiegel innerhalb 60 - 90 Minuten nach der ICD-Injektion erreicht (3).

Eine intravasale Fermentinaktivierung ist bisher nicht nachgewiesen worden.

6. Die Normalwerte der ICD beim Menschen

Wolfson und Williams-Ashman (45) geben die Normalwerte für den Menschen wie folgt an:

Männer	110 ± 49	(55 - 224)	WW-A.E.
Frauen	109 ± 56	(47 - 264)	WW-A.E.
Neugeborene	305 ± 91	(179 - 475)	WW-A.E.

Der Fermentspiegel von ICD soll dabei recht konstant sein. Die Angaben anderer Autoren entsprechen etwa den von Wolfson und Williams-Ashman angegebenen Aktivitäten. Soweit das verwendete Material zahlenmäßig eine endgültige Aussage gestattet - es wurden Untersuchungen von 22 Männern, 22 Frauen und 5 Neugeborenen durchgeführt -, können rasse- und geschlechtsbedingte Unterschiede ausgeschlossen werden. Mit Ausnahme bei Neugeborenen ist ein Alterseinfluß nicht nachgewiesen worden. Die Höhe des Serumweißgehaltes hat keinen Einfluß auf die ICD-Aktivitäten (45).

7. Die Serum-ICD-Aktivitäten bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen

Serum-ICD wurde in der Humanmedizin bei den verschiedensten Erkrankungen auf seinen diagnostischen Wert hin geprüft, und es stellte sich heraus, daß ihr Nachweis besonders bei Lebererkrankungen, teilweise aber auch bei denen des Herzens und der Lunge und bei Tumoren, soweit sie die Leber betreffen, zu differentialdiagnostischen Zwecken verwendet werden kann.

Bei der Virushepatitis ist der Serum-ICD-Spiegel über 10 Tage nach dem Beginn der Gelbsuch durchschnittlich um das 15- bis 20fache, maximal sogar um das 80fache erhöht. Bei normalem Krankheitsverlauf normalisiert sich dieser Anstieg der Serum-ICD in der dritten Woche nach Beginn der Gelbsucht. Folgt der akuten die chronische Form der Hepatitis, so können die Serum-ICD-Werte noch bis zu 4 Monate erhöht bleiben.

Da sich auch bei Todesfällen die Serum-ICD-Werte kurz vor dem Tode noch normalisierten, kann man sie nicht zur Prognose verwenden.

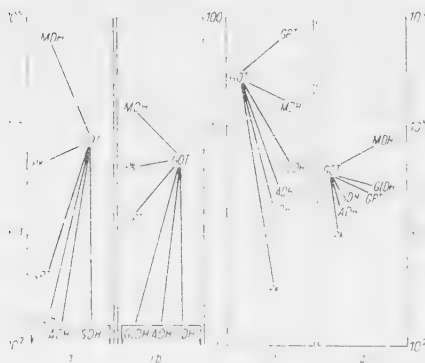
Bei der Zirrhose bewegen sich die Serum-Werte innerhalb der Normalwerte, oder sind nur geringgradig erhöht.

Bei extrahepatischem Ikterus sind die Serum-ICD-Werte ebenfalls normal. So kann man also mit Hilfe der Serum-ICD den extrahepatischen vom intrahepatischen Ikterus differentialdiagnostisch abgrenzen (6, 14, 18, 26, 30, 34, 38, 42, 44, 46).

Mit Hilfe von Tetrachlorkohlenstoff und anderen Stoffen konnten experimentell akute Leberzellschäden hervorgerufen werden. Dabei kam es 3 - 5 Stunden nach der Vergiftung zu den ersten Leberzellveränderungen in Form von Verfettungen. 6 Stunden nach der Vergiftung trat schon vermehrt ICD aus der Zelle aus (28).

Obwohl der ICD-Gehalt von Herzmuskel- und Lebergewebe etwa gleich groß ist, beobachtet man beim Herzinfarkt recht selten eine Serum-ICD-Erhöhung. Erst durch experimentell ausgelöste Herzinfarkte erhielt man 3 Stunden später erhöhte Enzymwerte, die aber nach 24 Stunden zur Norm zurückgekehrt waren. Vermutlich stellt man also wegen dieser kurzen Zeitspanne nur selten einen Serum-ICD-Anstieg fest. (6, 7, 37). Sind Herzerkrankungen mit Leberzellschäden gekoppelt, so können sich ebenfalls Serum-ICD-Anstiege zeigen.

Eine durch Insuffizienz des Herzens bedingte Leberstauung kann z. B. Leberzellschäden und damit eine Erhöhung der Serum-ICD bewirken.



Enzym-Aktivitäten (a) im normalen Herzmuskel, (b) im Serum bei Herzinfarkt, (c) im Serum bei Hepatitis, (d) in der normalen Leber³⁷⁾.

Außere Ordinate: Enzymaktivität in Bucher-Einheiten 100 mg Extrakt-Protein
Innere Ordinate: Enzymaktivität in Bucher-Einheiten/ml Serum

Abb. 3 nach Bergmeyer (3)

Für die Lunge gilt das gleiche wie für das Herz. Bei Leberstauungen, durch Lungenerkrankungen bedingt, kommt es zum Serum-ICD-Anstieg infolge Leberzellschäden.

Eine Differentialdiagnose zwischen Herz- und Lungeninfarkt ist nur möglich, wenn neben der GOT und LDH auch die GPT und die ICD bestimmt werden. Fehlt aber beim Lungeninfarkt eine akute Leberstauung, so fehlen meistens auch entsprechende Fermentänderungen.

Ein Myocardinfarkt kann nur dann angenommen werden, wenn die GOT und die MDH-Zunahme deutlich über denen der GPT und der ICD liegen. (Siehe auch Abb. 3 (7, 18, 19)).

Bei Nierenerkrankungen soll der Serum-ICD-Spiegel nicht signifikant erhöht sein (3).

Die Serum-ICD ist bei Tumoren nur dann deutlich erhöht, wenn die Tumoren oder ihre Metastasen die Leber betreffen. Bei anderen Tumoren bleibt die Serum-ICD normal (33, 43).

Auch bei Verletzungen bzw. Operationen ist die Serum-ICD nur dann kurzfristig erhöht, wenn die Leber selbst betroffen ist.

Während der Schwangerschaft sind keine Erhöhungen der Serum-ICD-Aktivitäten zu beobachten. Treten sie jedoch auf, muß man, da die Placenta reich an ICD ist, auch mit dem Vorliegen einer placentären Degeneration rechnen (9, 24).

Bei vielen anderen Krankheiten bleibt die Serum-ICD normal.

Man kann also sagen, daß die Serum-ICD mit einigen wenigen Ausnahmen eine große Leberspezifität aufweist und ihr Nachweis eine wichtige Ergänzung der diagnostischen Möglichkeiten ist.

8. Die ICD in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin hat die ICD bisher noch keine große Beachtung gefunden. Es sind nur wenige Veröffentlichungen bekannt, die sich mit diesem Ferment befassen.

So hat sich Cornelius (8) mit dem Nachweis der ICD beschäftigt und für verschiedene Tiergattungen die Aktivitäten einzelner Organe und von einer, allerdings kleinen Anzahl von Versuchstieren auch die Plasmanormalwerte bestimmt. Daneben findet auch er sowohl bei experimentellen Leberzellnekrosen bei Pferd, Kalb und Schaf, als auch bei klinischen Fällen von Hepatopathien des Pferdes erhöhte Plasma-ICD-Aktivitäten (5).

In Analogie zu den Verhältnissen beim Menschen fand Cornelius bei verschiedenen Haustieren hohe ICD-Aktivitäten in Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur (siehe Tabelle 1 und 2).

Untersuchungen an kranken Hunden sind bisher von klinischer Seite noch nicht beschrieben worden. Es liegen aber Ergebnisse bei experimentell erzeugten Herzinfarkten vor.

Tissue isocitric dehydrogenase (TPN-specific) activities in liver, kidney, heart, and skeletal muscle* from various species†

Species	Liver		Kidney		Heart		Skeletal muscle	
	Millimoles of TPNH formed per hour							
	Per g tissue	Per g protein	Per g tissue	Per g protein	Per g tissue	Per g protein	Per g tissue	Per g protein
Equine	2.49	13.3	4.44	18.2	0.750	3.29	1.01	9.91
Bovine	1.80	5.41	2.03	6.08	0.286	1.70	0.131	0.912
Ovine	1.48	2.64	1.88	28.3	0.198	0.978	0.201	0.690
Canine	0.459	1.51	1.52	5.57	0.649	2.90	0.134	0.672
Feline	0.358	0.663	0.130	0.696	0.0545	0.372	0.267	1.716
Chicken	3.15	8.88	2.36	8.28	1.25	5.60	0.653	4.38
Guinea pig	0.0632	0.588	4.32	6.30	0.347	1.82	0.228	1.03

* Sarcoplasmic muscle used in all species.

† All over 1 year of age except chickens and guinea pigs, which were less than 6 months of age.

Tabelle 1 ICD-Aktivitäten in Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskulatur
Zit. nach Cornelius (8)
(Original)

Plasma TPN-linked isocitric dehydrogenase activities in control horses, cattle, sheep, dogs, cats, chickens, and turkeys

Species	Age (yr)	Sex	No.	X	(S.D.)	(W.W.A. units/ml)	R
Horses	1-18	M & F	35	600 ± 200	33.7	291-1075	
Steers and non-lactating cows	1-6	M & F	14	817 ± 130	35.1	622-1036	
Lactating dairy cows	2	F	42	1,004 ± 167	25.8	565-1314	
Wethers	1-2	M	22	276 ± 166	35.5	78-659	
Ewes	1-8	F	26	276 ± 110	21.5	106-482	
Rams	1-2	M	34	225 ± 130	22.3	26-528	
Dogs	1-7	M & F	20	178 ± 99	22.2	27-437	
Cats	0.25-1	M & F	16	321 ± 190	47.5	118-708	
Chickens (White leghorns)	6 wk	M & F	17	558 ± 129	31.3	275-770	
Turkeys (Broad-breast bronze)	23 wk	M & F	20	524 ± 102	22.9	391-742	

x = mean; O = standard deviation; E = standard error; and R = range.

Tabelle 2 ICD-Aktivitäten im Plasma verschiedener Haustiere
Zit. nach Cornelius (8)
(Original)

II. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methode

Die eigenen Untersuchungen hatten zum Ziel, bei klinisch gesunden Hunden den Normalwert der Isozitronensäuredehydrogenase im Serum (SIDH) festzustellen. Die Auswahl der Tiere wurde nach folgenden Gesichtspunkten durchgeführt: Sie mußten gesund sein, oder die Erkrankung, wegen der sie zur Behandlung kamen, mußte solcher Art und Ausdehnung sein, daß mit einer Änderung der Serum-Aktivitäten nicht zu rechnen war.

Insgesamt wurden 109 Hunde verschiedener Rasse und unterschiedlichen Alters untersucht, darunter waren 58 männliche und 51 weibliche Tiere. Der klinisch erhobene Befund kann für jeden Hund aus der Tabelle 9 entnommen werden.

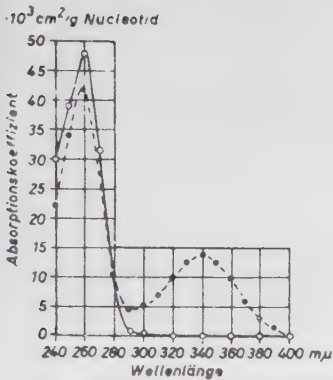
Bei der angewandten Untersuchungsmethode handelt es sich um einen optischen Test, der von Wolfson und Williams-Ashman (45) entwickelt und in einigen Punkten modifiziert wurde. Nach dem Prinzip des von Warburg entwickelten optischen Testes können bestimmte im Serum enthaltene Fermente nachgewiesen werden. Während des Reaktionsablaufes werden dabei gewisse Stoffe so umgeformt, daß sie bei bestimmten Wellenlängen das Durchtrittsvermögen des Lichtes durch die Lösung verändern. Aus der Geschwindigkeit, mit der das geschieht, kann auf die Reaktionsgeschwindigkeit und damit auf die Enzymaktivität im Serum geschlossen werden.

Wie oben schon erwähnt wurde, ist es die Aufgabe der ICD im Zitronensäurezyklus, die Isozitronensäure zu Oxalbernsteinsäure zu dehydrieren, die dann weiterhin in Anwesenheit von Mn^{++} zu α -Ketoglutar Säure decarboxyliert wird. Die ICD benötigt dazu als Coferment TPN, das während dieser Reaktion zu TPNH reduziert wird. (Neuerdings ist auch eine DPN-spezifische ICD im Serum gefunden worden. Sie spielt aber keine allzu große Rolle, da ihre Aktivität nur 1/10 - 1/30 der TPN-spezifischen beträgt.)

TPN, das so zu TPNH reduziert wird, kann das Licht bei einer Wellenlänge von 340 $m\mu$ nicht absorbieren. TPNH dagegen hat bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum (40). Man kann also auf Grund der Zunahme der optischen Dichte im Spektrophotometer bei 340 $m\mu$ auf die Menge der aus TPN gebildeten TPNH schließen (siehe Abb. 4).

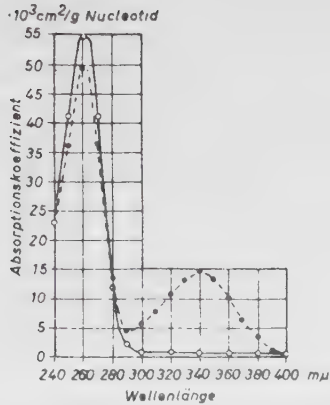
Die hier beschriebene Methode beruht auf diesem Prinzip. Durch Eichlösungen kann der für die Berechnungen wichtige millimolare Extinktionskoeffizient von TPNH bestimmt werden. Er beträgt 6,22 und besagt, daß eine millimolare Lösung von TPNH eine Extinktion von 6,22 hat. Dieser Wert ermöglicht, die TPNH-Molarität der jeweiligen Reaktionslösung zu errechnen. Da nun in der Reaktion ICD von dem Coferment TPN abhängig ist, kann man auf Grund der Umwandlungsgeschwindigkeit von TPN in TPNH auf die Fermentaktivität

schließen (45).



Triphospho-Pyridinnucleotid, als Ferment mit Kohlenhydrat hydriert (pH 7.4)

○---○ nicht hydriert
●---● hydriert



Diphospho-Pyridinnucleotid, als Ferment mit Kohlenhydrat hydriert (pH 7.4)

○---○ nicht hydriert
●---● hydriert

(O. Warburg und W. Christian (1936))

Abb. 4

Zur Bestimmung der ICD, die also eine Aktivitätsbestimmung ist und bei der die Geschwindigkeit von Substratumsatz pro Zeiteinheit gemessen wird, sind folgende Reagenzien nötig (2, 45):

1. Trispuffer
2. Triphosphopyridinnucleotid (TPN)
3. Manganchlorid ($MnCl_2$)
4. Kochsalzlösung
5. Isozitronensäure

ad 1. Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan, kurz Trispuffer

genannt, dient der Stabilisierung eines konstanten pH-Wertes. Wir verwenden eine 0,1 molare Lösung. Das Molekulargewicht von Trispuffer beträgt 121,1. Mit 12,11 g Trispuffer und einem Liter Aqua dest. als Lösungsmittel wird die Lösung hergestellt, und mit Hilfe von n/10 HCl und eines elektrischen pH-Meters wird ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Trispuffer ist sehr beständig; zeigen sich nach gewisser Zeit infolge Bakterienwachstums Schlieren, so sollte sicherheitshalber eine neue Lösung angesetzt werden (2).

ad 2. Triphosphopyridinnucleotid (TPN) muß ebenso wie das Substrat Isozitronensäure im Überschuß vorliegen, da der Mangel eines dieser beiden Stoffe zu einem Abweichen der Extinktionskurve von der Linearen während der Zeit, in der gemessen wird, führt. Aus der Gleichung



geht hervor, daß ein Mangel an Isozitronensäure oder TPN von einem bestimmten Punkt der Reaktion an, die bis dahin kontinuierliche TPNH-Bildung unterbrechen wird, wodurch ein weiteres lineares Ansteigen der optischen Dichte - bedingt durch die fehlende TPNH-Bildung - unterbleibt. Graphisch gesehen geht die Lineare dann in eine Parallele zur Abszisse über.

Die Firma C. F. Boehringer und Söhne GmbH, Mannheim, liefert TPN in Form seines Na-Salzes (TPN-NaH₂) mit einem Molekulargewicht von 765. Gefordert wird eine 0,001 molare Lösung; 7,65 mg TPN-NaH₂ in 10 ml einer 0,15molaren NaCl-Lösung entspricht dieser Forderung. Um einer Substraterschöpfung vorzubeugen, werden nun 8 mg TPN-NaH₂ in 10 ml 0,15 molarer NaCl-Lösung gelöst. Die Haltbarkeit ist begrenzt, deshalb empfiehlt sich ein tägliches Neuansetzen der Lösung.

ad 3. Manganionen als Zusatz haben, wie Bell und Baron (2) beschreiben, einen wesentlich günstigeren Einfluß auf die Reaktion als Magnesiumionen. Die Manganionen werden in Form einer 0,01 molaren Manganchloridlösung hinzugefügt. Dabei wird mit 1,979 g MnCl_2 und 0,15 molarer NaCl-Lösung ein Liter Lösung hergestellt.

ad 4. Für die Herstellung von 0,15 molarer NaCl-Lösung werden 8,77 g NaCl in einem Liter Aqua dest. gelöst.

ad 5. Wie das TPN muß auch das Substrat Isozitronensäure im Überschuß vorhanden sein. Es wird von der Firma Fluka (Schweiz) als Na-DL-Isozitat in den Handel gebracht.

Es wird als 0,1 molare Lösung verwendet. Dabei werden des Überschusses wegen 150 mg in 5 ml Trispuffer gelöst. Diese Lösung ist im Kühlschrank mindestens 8 Tage haltbar. Das Serum, dessen Fermentaktivität wir feststellen wollen, erhalten wir, indem Blut aus der Vene entnommen wird, das ohne Rücksicht auf seinen Gerinnungszustand zweimal je 10 - 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert wird, um so alle Erythrozytenspuren aus dem Serum zu entfernen. Es muß im Erythrozyten nämlich mit einer 80fach größeren Fermentaktivität gerechnet werden als im Serum. Aus diesem Grund sind hämolytische Seren ungeeignet.

Serum von Zitrat- und Heparinblut sollen ohne Aktivitätsveränderungen sein und somit verwendet werden können (18). Eine Anzahl von Experimenten zeigte, daß Seren, die mit Erythrozyten in Kontakt waren, über 5 Stunden bei Zimmertemperatur keine ICD-Aktivitätsänderungen aufwiesen. (45).

Lacteszente Seren können, da sie den Durchtritt des Lichtes stark beeinflussen, nicht verwendet werden.

Seren mit sehr hoher ICD-Aktivität werden entweder nur über die Hälfte der Zeit oder mit 0,15 molarer NaCl-Lösung verdünnt gemessen. Dabei soll das Serum, erst kurz bevor es zu den anderen Reagenzien pipettiert wird, verdünnt werden.

Für jede Bestimmung sind zwei Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm notwendig, die eine für die Reaktion, die andere für den Leerwert. Die Leerwertzelle spielt insoweit eine Rolle, als etwaige in ihr stattfindende Reaktionen, die die Extinktion bei $340\text{ m}\mu$ verändern können (was häufig der Fall ist) auch in der Reaktionszelle angenommen und berücksichtigt werden müssen.

Für die Inkubation in einem auf 25°C eingestellten Thermostaten (Wasserbad) wird der für die beiden Küvetten bestimmte Inhalt zunächst in zwei besonders gekennzeichnete Reagenzgläser pipettiert, die 15 - 20 Minuten im Wasserbad bleiben.

Beide Reagenzgläser enthalten die Reagenzien in folgenden Mengen:

- 1 ml Trispuffer pH 7,5 (0,1 molar)
- 0,4 ml TPN (0,001 molar)
- 0,6 ml MnCl_2 (0,01 molar)
- 1 ml des zu untersuchenden Serums

Das für die Leerwertzelle bestimmte Reagenzglas enthält dazu noch:

- 0,1 ml NaCl (0,15 molar)

Nach 15 - 20 Minuten Inkubation pipettiert man sofort 0,1 ml Isozitroneisäure (0,1 molar), die der Temperaturkonstanz wegen im gleichen Wasserbad (25°C) aufbewahrt wird, in die Reaktionsküvette.

Anschließend wird der Inhalt der beiden Reagenzgläser in die entsprechenden Küvetten gegeben. Der Inhalt wird gründlich mit Glasstäbchen vermischt, wodurch die Schlieren, die die Extinktion beeinflussen können, verschwinden.

Beide Küvetten werden nun in den Meßraum des Zeiss-Spektrophotometers PMQ II, mit einem Meßbereich von 200 - $1000\text{ m}\mu$ und einem Photowiderstand bis $2,5\mu$, gestellt, der mittels eines Thermostaten auf eine konstante Temperatur eingestellt werden kann, in diesem Fall auf 25°C . Als nächstes wird die Leerwertzelle auf Null

eingestellt, was bei Apparaten mit automatischer Null-einstellung entfällt. Es empfiehlt sich, zwischen Reaktions- und Meßbeginn eine Wartezeit von 2 - 3 Minuten einzulegen, da Versuche ergeben haben, daß durch anfängliche, überschießende Reaktionen in der Reaktionsküvette - gewissermaßen Initialzündungen - übermäßig hohe Extinktionszunahmen auftreten, die ein falsches Bild entstehen lassen. In der Regel genügt eine Wartezeit von 2 - 3 Minuten, um danach eine lineare Extinktionszunahme während der Meßzeit zu erhalten. Die Reaktion beruhigt sich also. Diese Wartezeit verlängert sich aber, wie die Messungen ergeben haben, auf 15 - 20 Minuten, wenn die Reaktion statt mit Isozitrone Säure mit Serum eingeleitet wird, d. h. wenn beide Küvetten vor Reaktionsbeginn folgenden Inhalt haben:

1 ml Trispuffer
0,4 ml TPN
0,6 ml $MnCl_2$

Außerdem enthält die Leerwertküvette noch

0,1 ml NaCl (0,15 molar)

und die Reaktionsküvette

0,1 ml Isozitrone Säure (0,1 molar).

Dazu wird nach der Inkubationszeit in jede Küvette je 1 ml des zu untersuchenden Serums pipettiert, wodurch die Reaktion nach erfolgter gründlicher Durchmischung (siehe oben) beginnt.

Es ist anzunehmen, daß diese unterschiedlich langen Wartezeiten bei den verschieden angesetzten Reaktionen darauf beruhen, daß die Reaktionen durch quantitativ recht unterschiedlichen Zusätze verschieden schnell ablaufen. Im ersten Fall wird nämlich die Reaktion durch den Zusatz von nur 0,1 ml Isozitrone Säure ausgelöst, im zweiten dagegen durch 1 ml Serum.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Fermentreaktionen mit Isozitronensäure eingeleitet.

Nach der oben schon erwähnten Wartezeit von 2 - 3 Minuten wird die Nulleinstellung des Leerwertes überprüft, und dann die Extinktion der Reaktionsküvette zum Zeitpunkt Null abgelesen. Alle 3 Minuten erfolgte dann über die Zeit von 12 Minuten eine Messung, wobei der Nullwert der Leerwertzelle immer wieder kontrolliert und - falls nötig - reguliert werden muß. Es wird also immer die Differenz beider Zellen bestimmt, wodurch eventuell in beiden Zellen andere die Extinktion bei $340\text{ m}\mu$ ebenfalls beeinflussende Reaktionen unberücksichtigt bleiben. Obwohl Versuche über 30 - 45 Minuten gleichmäßige Extinktionszunahmen ergeben haben, sollte man die Reaktionszeit von 12 - 15 Minuten doch einhalten, um möglichen durch Substraterschöpfung bedingten Abweichungen (besonders bei Seren mit hoher Enzym-Aktivität) vorzubeugen.

Die so gewonnenen Werte werden registriert, die Differenz zwischen erster und letzter Messung wird gezogen, und durch Multiplikation mit einem von der Einheit abhängigen Koeffizienten bekommt man die Zahl der Enzymeinheiten des entsprechenden Serums.

Aus der Vielzahl der Enzymeinheiten seien hier einige aufgeführt (3):

1. Wroblewski schlägt als Einheit der Fermentaktivität die Extinktionsänderung von 0,001 in einer Minute pro 3 ml Serum bei einer Temperatur von 23°C und einer Wellenlänge von $340\text{ m}\mu$ vor.
2. Die Büchereinheit entspricht der Extinktionsänderung von 0,100 bei $366\text{ m}\mu$, 25°C und 1 ml Serum in der Zeit von 100 Sekunden.

3. Die Internationale Einheit hat dagegen folgende Definition: 1 Einheit ist die Enzymmenge, die bei 25° C in einer Minute 1 μ Mol Substrat pro 1000 ml Serum umsetzt. 1 Millieinheit/ml Serum = 1/1000 Einheit (48).

4. Wolfson und Williams-Ashman geben die Werte in einer Einheit an, die sie wie folgt definieren:

1 Wolfson und Williams-Ashman Einheit (1 WW-A.E.) entspricht 1 Millimikromol des von 1 ml Serum in 1 Stunde bei 25° C gebildeten TPNH (45). Sie entspricht mit Ausnahme der Zeitangabe der Millieinheit der Internationalen Einheit.

Da in den verschiedenen Literaturangaben auch die anderen Einheiten benutzt werden, seien hier gleich die Umrechnungsfaktoren für die definierten Einheiten angegeben (siehe Tabelle 3 (3)).

Tabelle 3

Zur Umrechnung einer Einheit nach	in eine Einheit nach	multipliziert mit
Int. Einheit	Bücher	0,055
in Millieinheiten	Wroblewski	2,074
	WW-A. E.	60
Bücher	Int. Einheit	18,2
	Wroblewski	37,7
	WW-A. E.	1092
Wolfson und Williams-Ashman Einheit	Int. Einheit	0,0167
	Bücher	0,00092
(WW-A. E.)	Wroblewski	0,035

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Werte werden in der gleichen Einheit angegeben, wie sie Wolfson und Williams-Ashman verwenden.

Berechnung einer Ferment-Aktivität:

Als Beispiel wird folgende Reaktion angenommen:

Zeit t in Minuten	Absolute Extinktion E_1	Differenz zweier Messungen Δ
0	0,010	0,020
3	0,030	0,021
6	0,051	0,020
9	0,071	0,019
12	0,090	

$$\Delta E_1 = 0,080$$

$$\Delta E = 0,400$$

ΔE_1 ist die Extinktion pro 12 Minuten und für 1 ml Serum;
 ΔE dagegen die Extinktion auf 1 Stunde und 1 ml Serum be-
 zogen (gemäß der Definition unserer Einheit).

Mit Hilfe des bekannten millimolaren Extinktionskoeffi-
 zienten von TPNH, er beträgt 6,22 und besagt, daß eine
 millimolare TPNH-Lösung eine Extinktion von 6,22 hat, kan
 man errechnen, wieviel Millimikromole TPNH in 1 Stunde
 bei 25° C von der ICD eines Milliliters Serum aus TPN
 gebildet werden. So ergibt sich folgende Rechnung:

$$\begin{array}{rcl} 6,22 \text{ Extinktion} & - & 0,001 \text{ molare Lösung} \\ 0,4 \text{ Extinktion} & - & x \end{array}$$

$$x = \frac{0,001 \cdot 0,4}{6,22} = 0,000064$$

Bei einer Extinktion von 0,400 wurde TPNH in einer 0,000064 molaren Lösung vorliegen.

In beiden Küvetten befindet sich ein Inhalt von 3,1 ml.

1. Mol TPNH - 744000 mg

$$\frac{0,001 \cdot 0,4}{6,22}$$

Mol TPNH - x

$$x = \frac{744000 \cdot 0,001 \cdot 0,4}{6,22} \text{ mg TPNH}$$

In 3,1 ml der Reaktionslösung befinden sich auf 1 Stunde und 1 ml Serum bezogen:

$$1000 \text{ ml beinhalten } \frac{744000 \cdot 0,001 \cdot 0,4}{6,22} \text{ mg TPNH}$$

$$3,1 \text{ ml beinhalten } x$$

$$x = \frac{744000 \cdot 0,001 \cdot 3,1 \cdot 0,4}{6,22 \cdot 1000} \text{ mg TPNH}$$

$$744000 \text{ mg TPNH} - 1 \text{ Mol}$$

$$\frac{744000 \cdot 0,001 \cdot 3,1 \cdot 0,4}{6,22 \cdot 1000} \text{ mg TPNH} - x$$

$$x = \frac{744000 \cdot 0,001 \cdot 3,1 \cdot 0,4}{6,22 \cdot 1000 \cdot 744000} = \frac{0,001 \cdot 3,1}{6,22 \cdot 1000} \cdot 0,4$$

$$= 0,000 \ 000 \ 199 \ 4 \text{ Mol TPNH}$$

$$x = 199,4 \text{ m} \mu \text{ Mol TPNH}$$

Bei einer Extinktion von 0,4 bezogen auf 1 Stunde, 1 ml Serum und bei 25° C befinden sich in der Reaktionszelle mit 3,1 ml Inhalt 199,4 mμ Mol TPNH.

Nach der Definition der hier benutzten Einheit sind das 199,4 WW-A. E.

Da die Extinktion bei dieser Rechnung die einzige Variable ist, kann man die anderen Werte in Form eines Koeffizienten angeben. Er beträgt $k = 498,392$ und läßt sich aus folgendem Bruch errechnen:

$$k = \frac{0,001 \cdot 3,1}{6,22 \cdot 1000} = 498,392$$

Mit der Formel $E = a \cdot k$, wobei a die Extinktion, bezogen auf 1 ml Serum und 1 Stunde, und k der Koeffizient ist, kann man für jeden beliebigen a -Wert die dazugehörige TPNH-Menge in Millimikromol bestimmen. Um sich aber die für jeden Extinktionswert notwendige Multiplikation mit diesem Faktor zu ersparen, kann man sich mit seiner Hilfe eine Lineare zeichnen, aus der die Werte schnell und genau abgelesen werden können.

Werden die Messungen statt bei 340 bei 366 $m\mu$ durchgeführt, so gilt folgender Umrechnungsfaktor (16, 31):

Extinktion von DPNH bzw. TPNH bei

$$340 \text{ } m\mu : 366 \text{ } m\mu = 1,89 : 1,0$$

Die hier angewendete Methode entspricht im großen und ganzen der von Wolfson und Williams-Ashman (45) angegeben. Nur in folgenden Punkten unterscheidet sie sich von ihr:

1. Wolfson und Williams-Ashman geben bei ihrer Methode an, daß eine 0,001 molare TPN-Lösung (das sind 7,65 mg TPN gelöst in 10 ml einer 0,15 molaren NaCl-Lösung) und eine 0,1 molare Isozitronensäurelösung (das sind 258 mg Isozitronensäure gelöst in 10 ml einer Trispufferlösung) verwendet werden soll. Um aber einer möglichen

Substraterschöpfung vorzubeugen, wurden folgende Mengen verwendet: Statt 7,65 mg wurden 8 mg TPN und anstelle von 258 mg wurden 300 mg Isozitronensäure in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst.

2. Wolfson und Williams-Ashman beginnen die Reaktion durch Hinzufügen von Serum. Untersuchungen ergaben, daß es günstiger ist, die Fermentreaktion anstatt mit Serum mit Isozitronensäure einzuleiten. Die Methode wurde deshalb in dieser Weise abgewandelt.

3. Anstelle des Beckmann DU-Spektrophotometers wurde ein Zeiss-Spektrophotometers PMQ II mit automatischer Nullwerteinstellung und Thermostaten für den Meßraum verwendet. Da bei dem Zeiss-Spektrophotometer der messende Lichtstrahl den Meßraum in einer anderen Höhe als beim Beckmann-Modell durchläuft, trifft er den Küvetteninhalt nur zum Teil. Erst nach Verdopplung der einzelnen Komponenten werden vollwertige Messungen möglich. Dabei verdoppelt sich der Küvetteninhalt auf 3,1 ml. Die Berechnung der Enzymeinheiten ändert sich durch diese Manipulation nicht. Einerseits wird zwar die Extinktion pro Stunde durch Verdopplung des Serumanteils auf 1 ml halbiert, was aber andererseits durch Verdopplung des Küvetteninhalts und somit durch die doppelte TPNH-Menge wieder ausgeglichen wird.

2. Voruntersuchungen

Um mit der Bestimmung der Normalwerte der ICD im Serum beginnen zu können, waren zuerst zusätzliche Untersuchungen nötig über den methodischen Fehler, die Fermentstabilität während der Aufbewahrung und über eventuelle individuell bedingte Aktivitätsschwankungen.

a. Bestimmung des methodischen Fehlers

Durch Wäge-, Pipettier- und Ablesefehler, durch apparat- und temperaturbedingte Schwankungen und durch geringgradige Verunreinigungen der Küvettenoberfläche wird die Bestimmung dieses Fehlers notwendig, um sich bei der Bewertung der Messungen von vornherein über die Genauigkeit der Methode im klaren zu sein.

Mit ein und demselben Serum wird nun unter gleichen Bedingungen eine größere Anzahl von Messungen durchgeführt, aus deren Streuung dann mittels folgender Formel der methodische Fehler dieser Methode errechnet werden kann:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

s = die mittlere Streuung

x_i = die einzelne Messung

$\bar{x}$ = der Mittelwert

n = die Anzahl der Messungen

Von einem Institutshund wurde Blut entnommen und mit dem Serum eine Reihe von Messungen aufgestellt:

E = 0,164 = 81,74 WW-A.E.

E = 0,168 = 83,73 WW-A.E.

E = 0,168 = 83,73 WW-A.E.

E = 0,168 = 83,73 WW-A.E.

E = 0,168 = 83,73 WW-A.E.

E = 0,172 = 85,72 WW-A.E.

E = 0,160 = 79,74 WW-A.E.

E = 0,148 = 73,76 WW-A.E.

E = 0,192 = 95,69 WW-A.E.

E = 0,168 = 83,73 WW-A.E.

E = 0,180 = 89,71 WW-A.E.

E = 0,176 = 87,72 WW-A.E.

$\bar{x}$ = 84,38 WW-A.E.

s = $\pm$ 5,33

Der Variationskoeffizient
in Prozent:

VK = $\pm$ 6,32 %

Bei s = $\pm$ 5,33 aus einer Reihe von 12 Bestimmungen handelt es sich um einen Schätzwert für den unbekannten methodischen Fehler. Dieser Schätzwert ist als Zufallsgröße selbst Schwankungen ausgesetzt. Nach Weber (41) läßt sich beim Zugrundelegen einer Irrtumswahrscheinlich-

keit von 5 % folgendes Mutungsintervall (Konfidenzintervall) angeben:

$$P (L_{1\alpha} s \leq G \leq L_{2\alpha} s)$$

$$4,0 \leq G \leq 8,29$$

Bei sehr vielen Wiederholungen der 12fach-Bestimmungen am gleichen Hund kann erwartet werden, daß bei 95 % aller Stichproben der wahre, aber unbekannte methodische Fehler innerhalb der jeweils berechneten Intervalle liegt (siehe Weber Seite 423).

Als grobe Annäherung soll hier für den relativen methodischen Fehler folgendes Intervall angegeben werden:

$$4,74 \% \leq \text{rel. method. Fehler} \leq 9,82 \%$$

b. Bestimmung der Haltbarkeit des Fermentes im Serum

b₁. Schon bei der Bestimmung des methodischen Fehlers stellte sich heraus, daß nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur auch nach 8 Stunden keine Änderung der Fermentaktivität, die außerhalb des methodischen Fehlerbereichs lag, zu verzeichnen war. Dabei wurde ca. alle 20 - 40 Minuten eine Messung durchgeführt.

Von den 5 durchgeführten Serien sei hier eine als Beispiel aufgeführt:

Blutentnahme 14.30 Uhr

1. Versuch 18.25 Uhr	=	81,74 WW-A. E.
2. Versuch 18.50 Uhr	=	83,73 WW-A. E.
3. Versuch 19.15 Uhr	=	83,73 WW-A. E.
4. Versuch 19.40 Uhr	=	83,73 WW-A. E.
5. Versuch 20.05 Uhr	=	83,73 WW-A. E.
6. Versuch 20.30 Uhr	=	85,72 WW-A. E.

7. Versuch	20.55 Uhr	=	79,74 WW-A. E.
8. Versuch	21.20 Uhr	=	73,76 WW-A. E.
9. Versuch	21.45 Uhr	=	95,69 WW-A. E.
10. Versuch	22.05 Uhr	=	83,73 WW-A. E.
11. Versuch	22.25 Uhr	=	89,71 WW-A. E.
12. Versuch	22.50 Uhr	=	87,72 WW-A. E.

b₂. Auch bei der Aufbewahrung im Kühlschrank über den gleichen Zeitraum (8 - 10 Stunden) blieb, wie 6 Versuchsreihen zeigten, die Fermentaktivität ein und desselben Serums konstant. Hier eine der 6 Reihen:

1. Versuch	16.10 Uhr	=	75,75 WW-A. E.
2. Versuch	16.45 Uhr	=	71,77 WW-A. E.
3. Versuch	17.30 Uhr	=	71,77 WW-A. E.
4. Versuch	18.25 Uhr	=	69,77 WW-A. E.
5. Versuch	19.15 Uhr	=	65,79 WW-A. E.
6. Versuch	20.10 Uhr	=	65,79 WW-A. E.
7. Versuch	21.00 Uhr	=	71,77 WW-A. E.
8. Versuch	22.10 Uhr	=	69,77 WW-A. E.
9. Versuch	23.15 Uhr	=	67,78 WW-A. E.
10. Versuch	24.00 Uhr	=	69,77 WW-A. E.

Bei einer anderen dieser 6 Reihen hatten wir allerdings ein abweichendes Bild:

1. Versuch	14.25 Uhr	=	91,70 WW-A. E.
2. Versuch	14.50 Uhr	=	91,70 WW-A. E.
3. Versuch	15.15 Uhr	=	93,70 WW-A. E.
4. Versuch	15.40 Uhr	=	97,68 WW-A. E.
5. Versuch	16.00 Uhr	=	89,71 WW-A. E.
6. Versuch	16.25 Uhr	=	99,68 WW-A. E.
7. Versuch	16.50 Uhr	=	95,69 WW-A. E.
8. Versuch	17.10 Uhr	=	97,70 WW-A. E.
9. Versuch	17.35 Uhr	=	97,70 WW-A. E.
10. Versuch	18.20 Uhr	=	101,67 WW-A. E.

11. Versuch 18.50 Uhr	=	99,68 WW-A. E.
12. Versuch 19.15 Uhr	=	99,68 WW-A. E.
13. Versuch 19.35 Uhr	=	109,65 WW-A. E.
14. Versuch 19.55 Uhr	=	113,63 WW-A. E.
15. Versuch 20.15 Uhr	=	115,63 WW-A. E.
16. Versuch 20.40 Uhr	=	111,64 WW-A. E.
17. Versuch 21.00 Uhr	=	109,65 WW-A. E.
18. Versuch 21.20 Uhr	=	123,60 WW-A. E.
19. Versuch 21.45 Uhr	=	109,65 WW-A. E.
20. Versuch 22.10 Uhr	=	119,61 WW-A. E.

Bei dieser aus 20 Einzelversuchen bestehenden Reihe, wobei das Serum über die gesamte Versuchszeit im Kühlschrank aufbewahrt wurde, konnte man innerhalb der 8 Stunden eine ständige und deutliche Zunahme der Fermentaktivität feststellen. Bezogen auf den Anfangswert betrug sie etwa 30 %.

Als Erklärung käme eine kältebedingte Blockierung von Fermenthemmern in Frage. Wahrscheinlicher aber ist, daß ein durch die lange Versuchszeit bedingter Temperaturanstieg im Meßraum der RGT-Regel (Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel) folgend die Fermentreaktionen beschleunigen kann.

Wie Nachprüfungen an dem benutzten Gerät ergaben, steigt die Temperatur im Meßraum trotz Temperatur-Regler nach langer Betriebszeit des Gerätes an. Es ist daher zu empfehlen, die Temperatur zu kontrollieren.

b₃. Für die Untersuchung, über welchen Zeitraum hinweg eine Lagerung von Serum im Kühlschrank bei 4° C möglich ist, wurden 2 Seren über 4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt, von denen täglich jeweils eine Fermentaktivitätsbestimmung durchgeführt wurde (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	
1. Serum	85	89	80	90	WW-A.E.
2. Serum	110	112	114	110	WW-A.E.

Die Ergebnisse zeigen, daß über 4 Tage hinweg unveränderte Fermentaktivitäten gemessen wurden. Die Lagerung der Seren im Kühlschrank führt also nicht zum Schwund der ICD-Aktivität.

Bei Tiefkühlung soll die ICD-Aktivität über 21 Tage konstant bleiben.

c. Bestimmung der individuellen Serumfermentaktivität über einen und mehrere Tage

Vom 24.1. bis zum 30.1.1963 wurde von 3 Hunden je dreimal täglich, meist um 10, 14 und 20 Uhr, Blut entnommen (am 27.1. dagegen nur einmal bei "Jule"). Die gemessenen Fermentaktivitäten dieser Seren sind aus der Tabelle 5 - 7 und der Abbildung 5 - 7 zu ersehen.

Wolfson und Williams-Ashman (45) haben bei ihren Untersuchungen gleichzeitig den Serumweißgehalt bestimmt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Serumfermentaktivität und Eiweißgehalt zu finden. Ihrem Vorbilde folgend wurde auch bei diesen 3 Hunden jeweils der Serumweißgehalt nach der Biuretmethode gemessen. Die Konzentrationen sind gleichfalls aus der Tabelle 5 - 7 und der Abbildung 5 - 7 ersichtlich.

Die Meßergebnisse zeigten, daß der ICD-Spiegel im Serum nicht konstant ist, sondern sich innerhalb weniger Stunden erheblich verändern kann. Wie man aus den graphischen Darstellungen (Abb. 5 - 7) ersieht, steigt und fällt die Kurve bei "Toni II" und "Wittpot" innerhalb der 7 Tage

Tabelle 5

Toni II

	10.00 Uhr		14.00 Uhr		20.00 Uhr	
Tag	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%
24.1.	62	6,02	64	6,09	72	6,97
25.1.	80	6,07	86	-	92	6,24
26.1.	80	5,85	78	5,34	76	6,15
27.1.	-	-	-	-	-	-
28.1.	94	5,42	100	5,75	96	5,81
29.1.	70	5,17	85	5,25	65	5,19
30.1.	52	5,93	62	5,85	57	5,53

Tabelle 6

Jule

	10.00 Uhr		14.00 Uhr		20.00 Uhr	
Tag	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%
24.1.	108	6,73	112	6,46	92	-
25.1.	104	6,04	90	5,90	210	6,29
26.1.	92	6,77	108	6,44	173	6,24
27.1.	-	-	-	-	150	-
28.1.	80	5,27	88	5,58	118	5,87
29.1.	80	5,80	82	5,37	209	6,17
30.1.	105	5,44	85	5,76	90	5,30

Tabelle 7

Wittpot

	10.00 Uhr		14.00 Uhr		20.00 Uhr	
Tag	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%	WW-A.E.	g%
24.1.	80	6,87	74	6,36	92	6,10
25.1.	116	6,21	100	5,75	90	5,98
26.1.	103	7,41	94	6,14	96	6,02
27.1.	-	-	-	-	-	-
28.1.	100	5,28	108	5,50	116	5,10
29.1.	62	5,41	76	5,20	62	5,68
30.1.	90	5,46	87	5,51	72	7,41

allmählich, wenn man von kleinen Abweichungen, die im methodischen Fehlerbereich liegen, absieht. Die 20.00 Uhr-Werte von "Jule" sind dagegen fast regelmäßig bis zu 100 %, bezogen auf die Vor- und Nachmittagswerte, erhöht. Da die Erhöhung nach der Fütterung auftrat, lag die Vermutung einer alimentärbedingten Zunahme der Fermentaktivität nahe. Vor allem deshalb, weil am ersten Tag die dritte Blutentnahme, vor der Fütterung entnommen, keine Aktivitätserhöhung der Serum-ICD ergab.

Die Fütterung erfolgt normalerweise um 16.00 Uhr.

Zur Kontrolle wurde "Jule" deshalb am letzten Tag erst nach der Blutentnahme gefüttert. Die Messung ergab, auf die Vor- und Nachmittagswerte bezogen, keine Erhöhung.

d. Einfluß der Nahrungsaufnahme

Wenn man nun als ziemlich sicher annehmen kann, daß bei "Jule" durch die Futteraufnahme die Fermentaktivität von ICD erheblich anstieg, so muß man doch sehr vorsichtig sein, dieses Ergebnis auch auf andere Hunde zu übertragen, weil sich bei den anderen Versuchshunden nichts Ähnliches zeigte und "Jule", da ihr schon seit langem die Milz fehlt, möglicherweise anders reagiert.

Da es aber sehr wichtig ist zu wissen, ob der Serumfermentspiegel von ICD durch die Fütterung erhöht werden kann, wurde mit weiteren 4 Institutshunden folgender Versuch durchgeführt:

Kurz vor der Fütterung, sie erfolgte an diesem Tag um 10.00 Uhr, wurde bei den 4 Hunden die erste Blutentnahme vorgenommen und die Nüchternwerte von ICD bestimmt. Die Versuchshunde wurden anschließend gefüttert. Danach, im Abstand von 2, 3 und 5 Stunden, erfolgten die übrigen Blutentnahmen. Es ergaben sich folgende Werte (Tabelle 8):

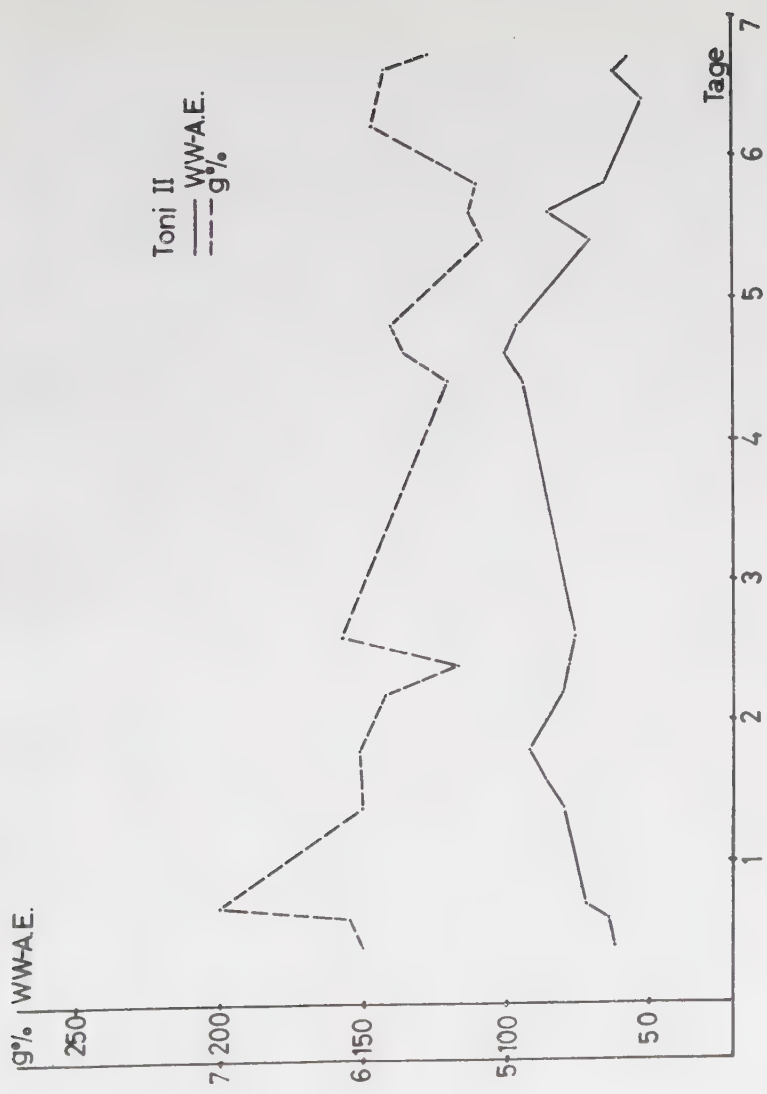


Abb. 5 ICD-Aktivitäten und Gesamteiweiß im Serum im Verlauf eines und mehrerer Tage

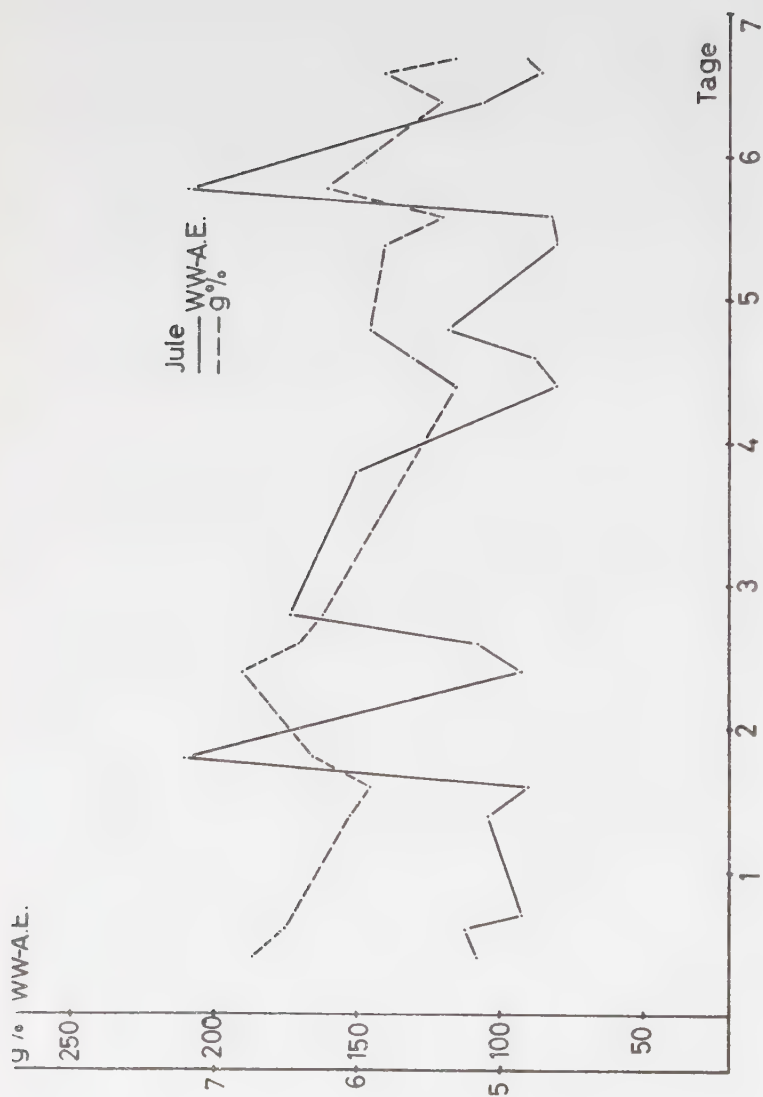


Abb. 6 ICD-Aktivitäten und Gesamtweiß im Serum im Verlauf eines und mehrerer Tage

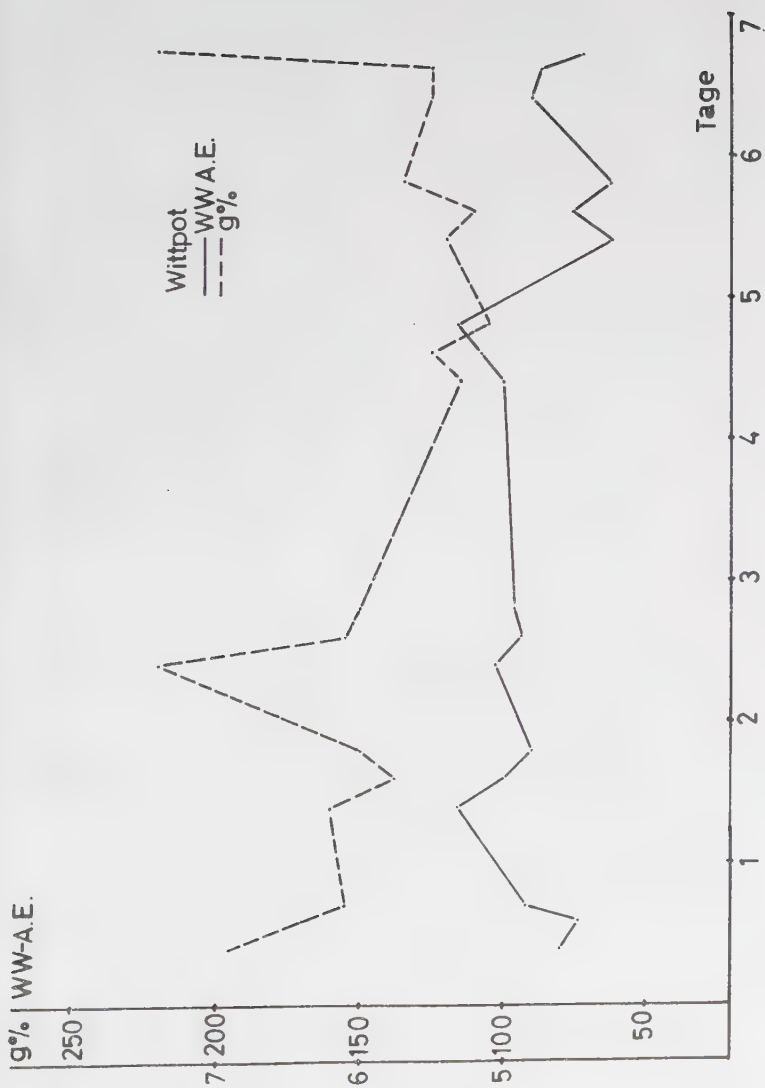


Abb. 7 ICD-Aktivitäten und Gesamtweiß im Serum im Verlauf eines und mehrerer Tage

Tabelle 8

Hund	Nüchternwert	2 Stunden	3 Stunden	5 Stunden nach der Fütterung
Wittpot	70	104	85	92
Dago	40	35	32	42
Rolf	60	45	32	40
Anka	87	95	87	127

Die Auswertung dieser Ergebnisse läßt nicht den allgemeinen Schluß zu, daß die Fütterung einen Einfluß auf den Serum-ICD-Spiegel hat, denn die Aktivitätsschwankungen der einzelnen Hunde über die 5 Stunden Versuchszeit müssen nicht durch die Fütterung bedingt gewesen sein. Die Untersuchungen zeigen, daß der Serum-Ferment-Spiegel ein und desselben Hundes auch innerhalb eines relativ kurzen Zeitabstandes erheblich schwanken kann.

Berücksichtigt man aber noch die früher gefundenen Werte von "Toni II" und "Wittpot", so kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Fütterung keine erhebliche Erhöhung des Serum-ICD-Spiegels verursacht.

Eine Beziehung zwischen Fermentaktivität und Serumeiweißgehalt konnte bei den 3 untersuchten Tieren nicht festgestellt werden. Aus diesem Grunde wurde bei den folgenden Fermentaktivitätsbestimmungen von einer zusätzlichen Eiweißbestimmung der zu untersuchenden Seren Abstand genommen.

3. Die Bestimmung der ICD im Serum klinisch gesunder Hunde

Die untersuchten 109 Hunde, 58 männliche und 51 weibliche Tiere, sind unter Angabe des Alters, des Geschlechtes und des klinischen Befundes in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9

Rasse	Alter und Geschlecht	Krankheit	Enzymeinheiten in WW-A.E.
1. Spitzbast.	13 Jahre männlich	Perinealtumor	132
2. Boxer	4 Jahre männlich	Tumor an der seidl. Brustwand	75
3. Langhaar-dackel	2 Jahre weiblich	Keratitis und Konjunktivitis	95
4. kl. Münsterländer	8 Jahre weiblich	Bißverletzung	62
5. SH	8 Jahre weiblich	Koprostase	177
6. Chow-Chow	12 Jahre männlich	Keratitis und Konjunktivitis	50
7. SH	11 Jahre männlich	Epitheldefekt am Nasenrücken	72
8. Cocker-Spaniel	6 Monate männlich	Zahnbruch	177
9. Welsh-Terrier	7 Jahre männlich	Harnröhren- und Blasensteine	112
10. Bastard	12 Jahre männlich	Blasensteine	92
11. SH	12 Jahre weiblich	Analbeutelentzündung	77
12. SH	6 Jahre weiblich	klinisch o. B.	97
13. SH-Bastard	3 Jahre männlich	klinisch o. B.	157
14. SH-Bastard	3 Jahre männlich	klinisch o. B.	105
15. SH-Bastard	3 Jahre männlich	klinisch o. B.	125
16. SH-Bastard	3 Jahre männlich	klinisch o. B.	80
17. SH-Bastard	9 Jahre männlich	klinisch o. B.	90
18. SH	3 Jahre weiblich	klinisch o. B.	67
19. SH	3 Jahre weiblich	klinisch o. B.	100
20. SH-Bastard	5 Jahre weiblich	klinisch o. B.	202

21. SH-Bastard	4 Jahre männlich	klinisch o. B.	97
22. Mittel- pudel	9 Jahre weiblich	Hüftgelenks- luxation	55
23. SH	9 Jahre männlich	Parese der Nach- hand	50
24. Spitzbast.	8 Jahre weiblich	Lähmung der Nach- hand	97
25. Spaniel	10 Monate männlich	Cystitis	92
26. Boxer	8 Jahre männlich	leichte Nachhand- parese	199
27. Hovawart	7 Jahre männlich	Perinealfistel	45
28. Langhaar- dackel	2 Jahre weiblich	Otitis ext.	75
29. Foxterrier	7 Jahre männlich	Otitis ext.	70
30. Terrier-Bast.	10 Jahre männlich	Analbeutel- entzündung	52
31. Boxer	7 Jahre weiblich	Mammatumor	57
32. SH	6 Jahre weiblich	Epitheldefekt am After	62
33. SH	6 Jahre weiblich	Perinealfistel	32
34. SH	6 Monate weiblich	Femurfraktur	150
35. SH-Bastard	10 Jahre weiblich	Mammatumor	177
36. Spaniel	2 Jahre männlich	Lahmheit	110
37. Terrier-Bast.	10 Jahre männlich	Tumor am After	117
38. Dobermann	14 Monate männlich	Hautmykose gerin- ger Ausdehnung	50
39. SH	6 Jahre männlich	Warze am Thorax	65
40. Boxer	8 Jahre weiblich	Tumor an der Brustwand	77
41. Vorsteh- Bastard	13 Jahre weiblich	Mammatumor	77
42. SH	3 Jahre männlich	Tonsillitis	47
43. Boxer	11 Jahre weiblich	klinisch o. B.	62

44. Klein-Pudel	10 Jahre männlich	Stomatitis	80
45. SH	9 Jahre weiblich	Mammatumor	60
46. Vorsteh- hund	9 Jahre weiblich	Mammatumor	57
47. SH	8 Jahre männlich	Perinealhernie	97
48. Bastard	6 Jahre weiblich	klinisch o. B.	77
49. Bastard	5 Jahre weiblich	klinisch o. B.	67
50. Bastard	5 Jahre weiblich	klinisch o. B.	67
51. Bastard	5 Jahre weiblich	klinisch o. B.	30
52. Bastard	5 Jahre weiblich	klinisch o. B.	65
53. Bastard	4 Jahre weiblich	klinisch o. B.	110
54. Bastard	6 Jahre weiblich	klinisch o. B.	67
55. Bastard	8 Jahre weiblich	klinisch o. B.	90
56. SH-Bastard	9 Jahre männlich	Zehentumor	100
57. Boxer	9 Jahre weiblich	Mammatumor	107
58. SH	9 Jahre männlich	Anal fistel	150
59. Spitz	11 Jahre weiblich	Zahnextraktion	70
60. SH-Bastard	5 Jahre weiblich	Otitis ext.	72
61. Boxer	5 Jahre männlich	Hornhautabszess	50
62. SH	2 Jahre weiblich	Vulvitis	165
63. Colli	2 Jahre männlich	klinisch o. B.	47
64. Spaniel	2 Jahre männlich	Otitis ext.	150
65. Dackel	1 Jahr weiblich	Tibiafraktur	17
66. Pudal	8 Jahre männlich	Gastritis	50
67. SH	8 Jahre weiblich	Atherom	40

68. Spaniel	9 Jahre männlich	Otitis ext.	60
69. Kurzhaar- dackel	8 Jahre weiblich	Mammatumor	77
70. SH	9 Jahre männlich	Otitis ext.	65
71. Langhaar- dackel	5 Jahre männlich	klinisch o. B.	52
72. SH	3 Jahre männlich	Schnittverletzung	57
73. SH	6 Monate männlich	klinisch o. B.	77
74. Teckel- bastard	14 Jahre männlich	Perinealhernie	147
75. Teckel	1 Jahr weiblich	Otitis ext.	115
76. Boxer	9 Jahre weiblich	Lahmheit	100
77. Teckel	4 Monate weiblich	Otitis ext.	80
78. Chow-Chow	11 Jahre männlich	Tumor im Fang	32
79. SH	11 Jahre männlich	Analtumor	65
80. SH	7 Jahre männlich	Analfistel	55
81. Cocker- spaniel	11 Jahre männlich	Tumor am linken Augenlid	80
82. SH	3 Jahre männlich	Bißwunde	52
83. Boxer	3 Monate männlich	klinisch o. B.	182
84. Boxer	3 Monate weiblich	klinisch o. B.	155
85. Boxer	3 Monate weiblich	klinisch o. B.	189
86. Boxer	3 Monate weiblich	klinisch o. B.	264
87. Boxer	3 Monate weiblich	klinisch o. B.	237
88. Boxer	3 Monate männlich	klinisch o. B.	207
89. Boxer	3 Monate weiblich	klinisch o. B.	189
90. Boxer	9 Jahre männlich	klinisch o. B.	77

91. Spitz-Bast.	8 Monate weiblich	klinisch o. B.	152
92. Spitz-Bast.	8 Monate männlich	klinisch o. B.	279
93. Spitz-Bast.	8 Monate männlich	klinisch o. B.	90
94. Spitz-Bast.	8 Monate männlich	klinisch o. B.	179
95. Spitz-Bast.	7 Monate männlich	klinisch o. B.	234
96. Spitz-Bast.	8 Monate weiblich	klinisch o. B.	259
97. Pudel	11 Jahre männlich	Atherom	187
98. Spaniel	9 Jahre männlich	Otitis ext.	40
99. Bastard	1 Jahr männlich	Demodikose geringer Ausdehnung	140
100. Spaniel	9 Jahre weiblich	Otitis ext.	105
101. SH-Bastard	4 Monate männlich	klinisch o. B.	234
102. SH-Bastard	4 Monate männlich	klinisch o. B.	172
103. SH-Bastard	4 Monate männlich	klinisch o. B.	214
104. SH-Bastard	4 Monate weiblich	klinisch o. B.	155
105. SH-Bastard	4 Monate weiblich	klinisch o. B.	160
106. SH-Bastard	4 Monate weiblich	klinisch o. B.	145
107. Irish-Setter	8 Jahre weiblich	klinisch o. B.	92
108. SH	8 Monate männlich	klinisch o. B.	137
109. Langhaar-dackel	11 Jahre männlich	klinisch o. B.	170

Aus der Vielzahl der Fälle galt es zuerst festzustellen, in welchem Maße eventuell Alter und Geschlecht für den Serum-ICD-Spiegel ausschlaggebend sind, bevor die Errechnung des Durchschnittswertes erfolgen konnte.

Die ermittelten Serumaktivitäten wurden deshalb zunächst nach Alter und Geschlecht geordnet und mit einander verglichen. Da das Material in den einzelnen Altersstufen verschieden groß ist, wurden jeweils zwei Jahrgänge zu einer Gruppe zusammengefaßt und die Mittelwerte errechnet (siehe Tabelle 10).

Bei der Betrachtung der Mittelwerte zeigte sich, daß ein geschlechtsbedingter Unterschied offensichtlich nicht vorhanden ist.

Hingegen besteht ein deutlicher Unterschied zwischen Jungtieren bis zu einem Jahr und den anderen Hunden.

Es wurden deshalb alle über ein Jahr alte Hunde zu einer Gruppe zusammengefaßt und der Gruppe der Jungtiere gegenüber gestellt.

Die Berechnung des Mittelwertes der Streuung des Einzelwertes und der Streuung des Mittelwertes nach den Formeln (41)

$$\begin{aligned}\bar{x} &= \frac{\sum x_i \cdot n_i}{n} \\ s_x &= \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot n_i}{n - 1}} \\ s_{\bar{x}} &= \frac{s_x}{\sqrt{n}}\end{aligned}$$

ergibt für die Gruppe der bis zu einem Jahr alten Hunde ($n = 25$)

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 174,8 \text{ WW-A. E.} \\ s_x &= \pm 55,8 \text{ WW-A. E.} \\ s_{\bar{x}} &= \pm 11,16 \text{ WW-A. E.}\end{aligned}$$

Tabelle 10

Alter	♂		♀		Durchschnittswerte der einzelnen Altersgruppen
	Einzelwert	Durchschnittswert	Einzelwert	Durchschnittswert	
0-1 Jahr	177 92 77 182 207 279 90 179 234 234 172 214 137	174,9	150 80 155 189 264 237 189 152 259 155 160 145	177,9	176,4
1-3 Jahre	50 140 110 47 47 150	90,7	16 115 95 67 75 165	88,8	89,8
3-5 Jahre	157 105 125 80 57 52 75 97	93,5	100 202 67 110	119,8	102,3
5-7 Jahre	50 52 65	55,7	67 30 85 73 97 63 32 77 67	63,5	61,5
7-9 Jahre	112 45 70 55 199 97 50	89,7	57 92 62 177 97 77 90 40 77	85,4	87,3
9-11 Jahre	90 50 100 150 60 65 77 40 52 117 80	80,1	55 60 57 107 100 105 177	94,4	85,6
über 11 Jahre	71 32 65 80 187 132 50 92 147 170	102,6	62 70 77 77	71,5	93,71

und für die Gruppe der über ein Jahr alten Hunde (n = 84)

$$\bar{x} = 87,14 \text{ WW-A. E.}$$

$$s_{\bar{x}} = \pm 41,21 \text{ WW-A. E.}$$

$$s_{\bar{x}} = \pm 4,49 \text{ WW-A. E.}$$

Die Differenz beider Mittelwerte $\Delta = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$
ist

$$\Delta > 3 s_{\Delta}$$

$$s_{\Delta} = \pm \sqrt{\frac{s_{x_1}^2}{n_{x_1}} + \frac{s_{x_2}^2}{n_{x_2}}}$$

und damit sicher signifikant (15).

Eine Prüfung des Materials, ob eine normale Verteilung vorliegt, wurde bei der Gruppe der jungen Hunde wegen der kleinen Zahl von untersuchten Tieren unterlassen.

Die Verteilung der bei den 84 älteren Hunden ermittelten ICD-Aktivitäten auf gleich große Klassen von 0 - 220 WW-A.E. geht aus der Tabelle 11 und der Abb. 8 hervor.

Tabelle 11

Klassenbreite	Klassenmitte x_i	n_i
0 - 19 WW-A.E.	10	1
20 - 39 WW-A.E.	30	3
40 - 59 WW-A.E.	50	18
60 - 79 WW-A.E.	70	25
80 - 99 WW-A.E.	90	12
100 - 119 WW-A.E.	110	11
120 - 139 WW-A.E.	130	2
140 - 159 WW-A.E.	150	5
160 - 179 WW-A.E.	170	4
180 - 199 WW-A.E.	190	2
200 - 220 WW-A.E.	210	1

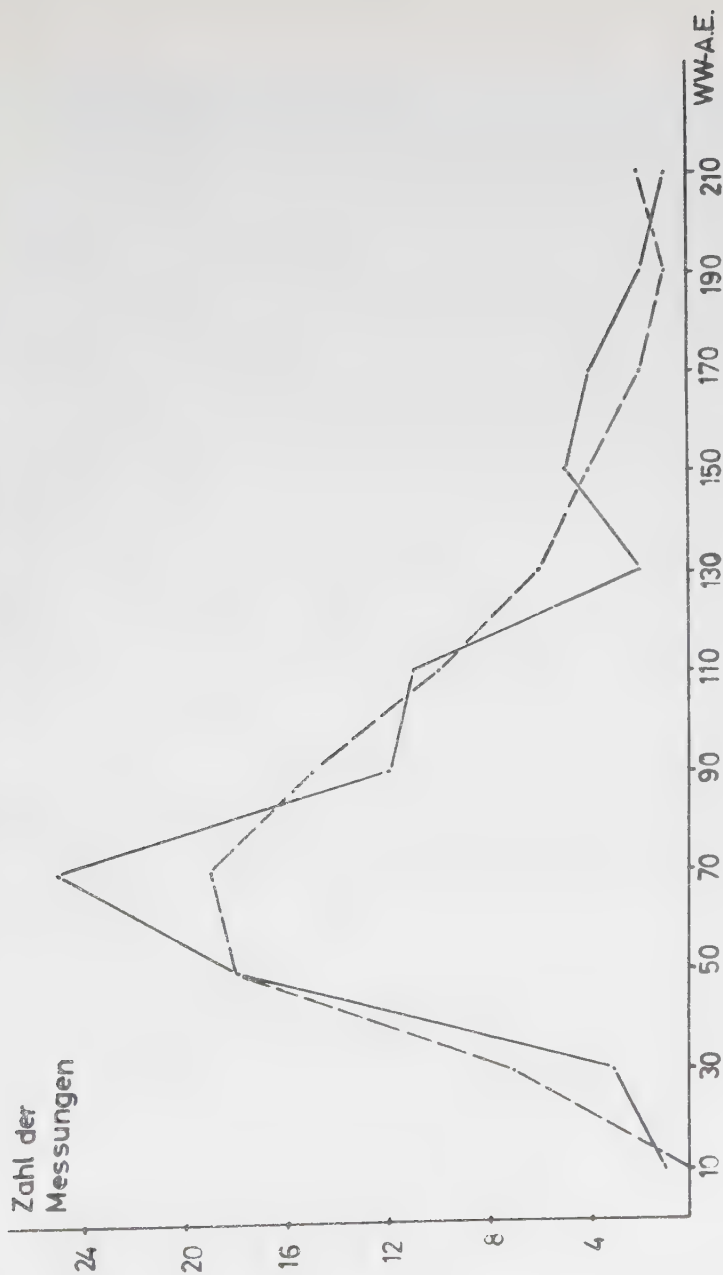


Abb. 8 ——— Empirische Häufigkeitsverteilung der SICD-Werte von 84 Hunden bei einer Klassenbreite von 20 WW-A.E.
 ----- Modell einer logarithmischen Normalverteilung unter Verwendung der Parameter x und s der empirischen Häufigkeitsverteilung

Sie bietet das Bild einer schiefen Verteilung.

Rein optisch und mit Hilfe des χ^2 -Anpassungstestes (siehe Weber) (41) geprüft - ergibt sich, daß keine Normalverteilung vorliegt.

Da bei biologischen Größen schiefe Verteilungen eine häufige Erscheinung sind (29), wurde wiederum mit Hilfe des χ^2 -Anpassungstestes geprüft, ob die empirisch ermittelte Häufigkeitsverteilung mit der als Nullhypothese gewählten logarithmischen Normalverteilung verträglich ist; $\bar{x}$ und s werden aus dem empirischen Material mit Hilfe der folgenden Formeln geschätzt:

$$\bar{x} = \frac{\sum \lg x_i \cdot n_i}{n} = \lg \bar{x}$$

$$s_x^2 = \frac{1}{n-1} \left[\sum (\lg x)^2 \cdot n_i - \frac{(\sum \lg x \cdot n_i)^2}{n} \right]$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

So ergibt sich:

$$\lg \bar{x} = 1,8923 ; \bar{x} = 73,03 \text{ WW-A.E.}$$

$$s_x = \pm 0,2128$$

$$s_{\bar{x}} = \pm 0,0231$$

Unter Verwendung der geschätzten Parameter konnte mit Hilfe des χ^2 -Anpassungstestes bewiesen werden, daß die empirische Häufigkeitsverteilung mit der als Nullhypothese gewählten logarithmischen Normalverteilung verträglich ist ($P_{\%} \approx 25 \%$).

Der auf Grund dieser Verteilung errechnete Mittelwert beträgt 73,03 WW-A.E.,

der Bereich $\pm 2s = 29,3 - 207,8$ WW-A.E.

und der

Bereich $\pm s = 47,8 - 127,4$ WW-A.E.

III. Diskussion

Die ICD-Aktivität im Serum klinisch gesunder Hunde wurde mit der von Wolfson und Williams-Ashman (45) entwickelten Methode bestimmt. Diese wurde in einigen Punkten modifiziert:

a. Wolfson und Williams-Ashman fordern eine 0,001 molare TPN-Lösung und eine 0,1 molare Isozitronensäurelösung. Da der Reaktionsablauf von diesen Stoffen abhängig ist, und es beim Vorliegen hoher Fermentkonzentrationen im Serum vorkommen kann, daß die Reaktion beim Mangel an diesen Stoffen vorzeitig beendet wird, empfiehlt es sich, sie von vornherein im Überschuß anzubieten. Aus diesem Grunde wurden etwas größere Mengen von TPN und Isozitronensäure bei der Herstellung der Lösungen verwendet.

b. Wolfson und Williams-Ashman beginnen die Reaktion nach der 15 - 20 Minuten dauernden Inkubationszeit durch Hinzufügen von 1 ml Serum zu beiden Küvetten.

Die eigenen Untersuchungen haben ergeben, daß es in beiden Küvetten über einen längeren Zeitraum zu Extinktionsänderungen bei 340 m μ kommen kann, die ein Messen erst nach 10 - 15 Minuten erlaubt. Die Reaktion beruhigt sich wesentlich rascher - nach 2 - 3 Minuten -, wenn sie mit der kleinen Isozitronensäuremenge eingeleitet wird. Es wurde deshalb so verfahren.

Der methodische Fehler, der im Rahmen der Voruntersuchungen ermittelt wurde, beträgt $\pm 6,23\%$, in grober Annäherung ließ sich ein Intervall von $4,74\% - 9,82\%$ errechnen. Der methodische Fehlerbereich ist demnach recht groß; bei weiteren Untersuchungen wird es zweckmäßig sein, mindestens Doppelbestimmungen vorzunehmen.

Während beim Menschen von einer großen individuellen Konstanz der Serum-ICD gesprochen wird, ergaben die Untersuchungen beim Hund, daß allein schon im Abstand weniger Stunden der Serum-ICD-Spiegel recht erheblich schwanken kann. Welche Faktoren dafür ausschlaggebend sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Auf alle Fälle konnte aber der durch eine Versuchsreihe (Bastard "Jule" Abb. 6 und Tabelle 6) ausgelöste Verdacht einer alimentären Serum-ICD-Erhöhung durch Fütterungsversuche mit anderen Hunden nicht erhärtet werden.

Die bei "Jule" nach der Fütterung auftretenden Serum-ICD-Erhöhnungen konnten nicht geklärt werden; man muß bei der Interpretation dieses Befundes vorsichtig sein, da dem Tier die Milz fehlt.

Ratten, die mit hohen Dosen von Glucose und Fruktose gefüttert wurden, zeigten ebenfalls keine Serum-ICD-Erhöhung, die mit der Fütterung in Beziehung gebracht werden konnte (13).

Serumeiweißbestimmungen, die von Wolfson und Williams-Ashman (45) gefordert werden, weil sie einen Zusammenhang zwischen Eiweißgehalt und ICD-Aktivität des Serums vermuten, wurden bei einer Reihe von Hunden vergleichsweise vorgenommen.

Es konnte keine Beziehung zwischen diesen beiden Größen festgestellt werden, so daß bei weiteren Untersuchungen eine Serumeiweißbestimmung nicht ausgeführt wurde.

Auch beim Menschen ließ sich letztlich zwischen der ICD und dem Gesamteiweiß des Serums keine Beziehung erkennen (14).

Bei der Auswertung der 109 Einzeluntersuchungen stellte sich heraus, daß junge Hunde einen nahezu doppelt so hohen Serum-ICD-Spiegel haben wie ältere. Dies überrascht nicht, denn auch bei einer Reihe anderer Fermente findet man bei jungen Hunden bis zum Eintritt der körperlichen Reife vergleichsweise hohe Werte (20, 47).

Bei Untersuchungen von 5 neugeborenen Kindern sahen Wolfson und Williams-Ashman ebenfalls erhöhte Serum-ICD-Werte, die dabei nahezu dreimal so hoch waren wie beim Erwachsenen. Da beim jungen, wachsenden Organismus die Stoffwechselvorgänge wesentlich rascher ablaufen, kann man hier einen Zusammenhang zwischen höherer Zell-Leistung und den höheren Fermentaktivitäten im Serum vermuten.

Bei 25 jungen Hunden bis zu einem Jahr wurde
eine mittlere ICD-Aktivität von 174,8 WW-A.E.,
mit einem mittleren Fehler des
Einzelwertes von $\pm 55,8$ WW-A.E.
und einen mittleren Fehler des
Mittelwertes von $\pm 11,16$ WW-A.E.
ermittelt.

Bei 84 über ein Jahr alten Hunden ergab sich
ein Mittelwert von 87,14 WW-A.E.,
ein mittlerer Fehler des
Einzelwertes von $\pm 41,21$ WW-A.E.
und ein mittlerer Fehler des
Mittelwertes von $\pm 4,49$ WW-A.E.

Bei der statistischen Bearbeitung des Materials zeigte
sich, daß keine symmetrische Normalverteilung, sondern
eine schiefe Verteilung des Materials vorliegt, die einer
logarithmischen Normalverteilung entspricht.

Auf Grund dieser Verteilung ergibt sich

ein Mittelwert von 73,03 WW-A.E.,
ein Bereich $\pm s = 47,8 - 127,4$ WW-A.E.
und ein Bereich $\pm 2s = 29,3 - 207,8$ WW-A.E.

Cornelius (8), der die ICD-Aktivität im Plasma von
20 Hunden, 1 - 7 Jahre alt, mit der gleichen Methode be-
stimmte, kam zu etwas anderen Ergebnissen. Er gibt einen
Mittelwert von 178 WW-A.E.,
einen mittleren Fehler des
Einzelwertes von ± 99 WW-A.E.,
einen mittleren Fehler des
Mittelwertes von ± 22 WW-A.E.
und einen Schwankungsbereich von 27 - 437 WW-A.E.
an.

Der Mittelwert liegt demnach höher, und der Schwankungs-
bereich ist wesentlich größer.

Es erscheint wenig wahrscheinlich, daß diese Differenzen allein methodisch bedingt sind. Vielleicht waren unter seinem Material mehr einjährige als ältere Hunde. Werte über 400 WW-A.E. möchte man allerdings nach den eigenen Untersuchungsergebnissen für pathologisch halten.

IV. Zusammenfassung

1. Die hier benutzte Methode ist von Wolfson und Williams-Ashman entwickelt worden. Sie wurde in einigen Punkten modifiziert:

So verwendete man hier, um einem Substratmangel vorzubeugen, der die TPNH-Bildung beeinträchtigen kann, etwas höhere TPN- und Isozitronensäurekonzentrationen als angegeben.

Da die Einleitung der Reaktion mit Serum bis zur Beruhigung der Reaktionen in beiden Küvetten längere Wartezeiten erfordert als die Einleitung mit Isozitronensäure, wurden alle folgende Reaktionen mit Isozitronensäure eingeleitet.

Da anstelle des Beckmann-DU-Spektrophotometers ein Zeiss-Spektrophotometer verwendet wurde, mußte des höheren Strahlenganges wegen der Küvetteninhalt verdoppelt werden.

2. Der methodische Fehler ist recht groß, er beträgt $\pm 6,32 \%$; für den methodischen Fehler kann folgendes Intervall angegeben werden: $4,74 \% - 9,82 \%$.

3. Die Haltbarkeit der IOD-Aktivität im Serum beträgt bei Zimmertemperatur etwa 6 - 8 Stunden, bei Kühlschranklagerung zeigten sich auch nach 4 Tagen keine Aktivitätsänderungen.

4. Bei der Bestimmung der Normalwerte zeigte es sich, daß zwischen jüngeren, bis zu einem Jahr alten und älteren Hunden unterschieden werden muß.

Die 25 jungen Hunde hatten

einen Mittelwert von

174,8 WW-A.E.,

einen mittleren Fehler des

Einzelwertes von

$\pm 55,8$ WW-A.E.

und einen mittleren Fehler

des Mittelwertes von

$\pm 11,16$ WW-A.E.

Die älteren Hunde (85 Tiere) hatten einen
Mittelwert von 87,14 WW-A.E.,
einen mittleren Fehler des
Einzelwertes von $\pm$ 41,21 WW-A.E.
und einen mittleren Fehler des
Mittelwertes von $\pm$ 4,49 WW-A.E.

Es zeigte sich, daß bei den älteren Hunden eine schiefe
Verteilung vorlag, die sich als logarithmische Normal-
verteilung herausstellte. Legt man diese der Rechnung
zu Grunde, so ergibt sich ein

Mittelwert von 73,03 WW-A.E.,
der Bereich $\pm$ s beträgt 47,8 - 127,4 WW-A.E.
und der Bereich $\pm$ 2s beträgt 29,3 - 207,8 WW-A.E.

5. Bei der Auswertung der Meßergebnisse ließ sich ein
geschlechtsbedingter Unterschied der ICD-Aktivitäten
ausschließen.

6. Es stellte sich heraus, daß der ICD-Spiegel ein und
desselben Tieres innerhalb kurzer Zeit erheblich schwanken
kann, dabei scheint die Futteraufnahme auf den ICD-
Spiegel keinen Einfluß zu haben.

V. Literaturverzeichnis

1. Amelung, D. Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Frage der Fermentelimination aus dem Serum
Klin.Wschr. 36,963 (1958)
2. Bell, J.L., u.
 Baron, D.N. A colorimetric method for determination of isocitricdehydrogenase
Clin.Chem.Acta 5,740 (1960)
3. Bergmeyer, H.U. Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstraße 1962
4. Bowers, G.N., u.a. Measurement of isocitricdehydrogenase activity in body fluids
Amer.J.Clin.Path. 34,513 (1960)
5. Boyd, S.W. The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats
Res.Vet.Sci. 3,256 (1962)
6. Cohen, N.N., u.a. An evaluation of isocitricdehydrogenase in liver disease
Annalsof Internal Medicine
55,604 (1961)
7. Colldahl, H. A study of serum enzymes in patients suffering from periodsof respiratory insufficiency, especially asthma and emphysema
Acta Medica Scand. 166,399 (1960)
8. Cornelius, Ch.E. SICD-aktivities in domestic animals with experimental hepatic necroses and in equine hepatopathie
Cornell Vet. 51,559 (1961)

9. Dawkins, M.J.R., The detection of placental degene-
MacGregor, W.G., u. ration during pregnancy. Serum
MacLean, A.E.M. isocitricdehydrogenase activity
Lancet II, 827 (1959)

10. Dubach, V.C., u. Enzymatic activity of isolated
Recant, L. glomerulus in normal and nephrotic
rats
J.Clin.Invest. 39, 1364 (1960)

11. England, E., u. The mechanism of the aconitase
Colowick, C. and ICD-activity
J.Biol.Chem. 226, 1047 (1957)

12. Ernster, L., u. Studies on TPN-linked oxydation.
Navazio, F. I. Pathways of isozitrate oxyda-
tion in liver mitochondria
Biochem.Biophys.Acta 26, 408 (1957)

13. Fitch, W.M., u. Extent and patterns of adaption
Chaikoff, I.L. of enzyme activities in livers
of normal rats, fed diets high
in glucose and fructose
J.Biol.Chem. 235, 554 (1960)

14. Franken, F.H., u.a. Die diagnostische Bedeutung der
Isozitronensäuredehydrogenase und
der Glutathionreductase bei Leber-
erkrankungen
Klin.Wschr. 38, 800 (1960)

15. Freudenberg, K. Grundriß der medizinischen Sta-
tistik 1962, F.K. Schattauer-Ver-
lag Stuttgart

16. Horecker, B.L., u. The extinktionscoefficients of the
Kornberg, A. reduced band of pyridinnucleotides
J.Biol.Chem. 175, 385 (1948)

17. Kerppola
Serum TPN-linked enzymes glucose-6-phosphate dehydrogenase. Isocitric dehydrogenase and glutathion reductase activities in health and various disease states
Acta Med.Scand. 164,357 (1959)
18. Klaus, D.
Diagnostische Möglichkeiten mittels Bestimmung der Serum-Isozitrone-säuredehydrogenase
Verh.Dtsch.Ges.inn.Med.Verl.Bergm. 66,219 (1960)
19. Klaus, D., u.
Zeh, D.
Die Differentialdiagnose zwischen Herz- und Lungeninfarkt durch Bestimmung von Fermentaktivitäten im Serum
Dtsch.med.Wschr. 86,480 (1961)
20. Lettow, E., u.
Jäger, Ch.
Die Leucin-Amino-peptidase-Aktivität im Serum klinisch gesunder Hunde
Tierärztl.Umschau 18, 294 (1963)
21. Löhr, G.W.,
Waller, H.D., u.
Grass, R.
Beziehung zwischen Blättchenstoffwechsel und Retraktion des Blutgerinnsels
Dtsch.med.Wschr. 86,397 (1961)
22. Löwenstein, J.M.
The pathway of hydrogen in biosyntheses. II. Extramitochondrial isocitrate dehydrogenase.
J.Biol.Chem. 226,1217 (1961)
23. Markert, C.L., u.
Moller, F.
Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species specific patterns
Proc.Nat.Acad.Sci. 45,753 (1959)

24. Norberg, A. Serum enzyme studies in some icteric conditions
Clin.Chem.Acta 6,264 (1961)
25. Ochoa, S. Biosynthesis of tricarboic acids by carbon dioxide
J.Biol.Chem. 174,123 (1948)
26. Okumura, M., u.a. Serum isocitric dehydrogenase activity in the differential diagnosis for liver disease
Gastroenterology 39,305 (1960)
27. Rees, E.D., u. Huggins, Ch. Steroid influences on respiration, glycolysis, and levels of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases of experimental mammary cancers
Cancer Res. 20,963 (1960)
28. Rees, E.D., u. Sinha, K.P. Blood enzymes in liver injury
J.Pathol.Bact. 80,297 (1960)
29. Reich, Th. Idee und Praxis der medizinischen Statistik
Verlag H. Huber, Bern und Stuttgart 1964
30. Richterich, R. Enzymdiagnostik der Lebererkrankungen
Schweiz.med.Wschr. 93,1363 (1963)
31. Richterich, R., u.a. Wahl der Enzymeinheiten bei diagnostischen Untersuchungen
Klin.Wschr. 39,987 (1961)
32. Rose, Z.B. Studies on the mechanism of action of isocitric dehydrogenase
J.Biol.Chem. 235,176 (1960)

33. Rose, A., u.a. V. Isocitric dehydrogenase, amelic dehydrogenase and glycolytic enzymes in patients with carcinoma of the breast
Cancer 14,726 (1961)
34. Rymenant, M., u.a. Enzymes in clinical medicine
New Engl.J.Med. 261,1325 (1959)
35. Siebert, G.,
Carsiotis, M., u.
Plaut, G.W.E. The enzymatic properties of isocitricdehydrogenase
J.Biol.Chem. 226,977 (1957)
36. Siebert, G., u.a. The preparation of isocitric dehydrogenase from mammalian heart
J.Biol.Chem. 226,965 (1957)
37. Strandjord, P.E.,u. Studies on isocitric and lactic dehydrogenases in experimental myocardial infarction
Thomas, K.E.
J.Clin.Invest. 38,2111 (1959)
38. Sterkel, R.L.,
Spencer, J.A.,
Wolfson,S.K. jr.,u. Serum isocitric dehydrogenase activity with particular reference to liver disease
Williams-Ashman
J.Lab.Clin.Med. 52,176 (1958)
39. Straub, F.B. Biochemie
Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest 1960
40. Warburg, O., u. Biochem.Z. 287,291 (1936)
Christian, W. zit. bei Coper, H. und Herken, H.
Dtsch.med.Wachr. 88,2025 (1963)
41. Weber, E. Grundriß der biologischen Statistik
4. Auflage 1961, Fischer Verlag Jena

42. White, L.P. Some enzymes in the comparison of multiple serum enzyme levels
Ann.N.Y.Acad.Sci. 75,349 (1958)
43. White, L.P. Serum enzymes. II. Glycolytic enzymes in patient with cancer and other diseases.
J.Nat.Canc.Inst. 21,671 (1958)
44. Wolfson,S.K. jr., Clinical and experimental studies
Spencer, I.A., on serum pyridin nucleotide-linked
Sterkel, R.L., u. dehydrogenases in liver damage
Williams-Ashman, H.G. Ann.N.Y.Acad.Sci. 75,260 (1958)
45. Wolfson, S.K. jr.,u. Isocitric and 6-phosphogluconic
Williams-Ashman,H.G. dehydrogenase in human blood
serum
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.N.Y.
96,231 (1957)
46. Wolfson, S.K. jr.,u. Serum TPN-specific enzymes in
Williams-Ashman,H.G. liver disease
Fed. Proc. 16,273 (1957)
47. Würzner, P. Glutaminsäure-Oxallessigsäure-
Transaminase (GOT), Glutaminsäure-
Brenztraubensäure-Transaminase
(GPT) und Milchsäuredehydrogenase
(MDH) im Serum klinisch gesunder
Hunde
Vet.med.Dis. Berlin FU 1959
48. Verfasser nicht Report of Commission of Enzymes
genannt of the International Union of
Biochemistry (IUB), Symposium
Series Vol. 20 Pergamon Press
London 1961

Frau Priv. Doz. Dr. E. Lettow möchte ich für die Überlassung des Themas und für ihre Unterstützung danken.

Daneben gilt mein besonderer Dank Herrn Priv. Doz. Dr. H. Coper vom Pharmakologischen Institut der Medizinischen Fakultät der FU Berlin, der mir in chemischen Fragen behilflich war.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Priv. Doz. Dr. H. Niepage für seine ständige Hilfsbereitschaft und Herrn Dipl.-Kfm. H. Weiss für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse.

Für die Arbeitserlaubnis im Labor der Rinderklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der FU Berlin möchte ich dem Direktor Herrn Prof. Dr. J. Heidrich sowie seinem Assistenten Herrn Dr. H. Lupke für dessen Unterstützung danken.

L e b e n s l a u f

Am 11. Juni 1938 wurde ich, Axel Block, als Sohn des Brunnenbaumeisters Max Block und seiner Ehefrau Anne, geb. Bauch, in Pretzsch an der Elbe geboren.

Da mein Vater nach dem Kriege in Forst bei Bruchsal eine neue Anstellung fand, siedelten wir im Mai 1950 nach dort über. In Bruchsal besuchte ich das Realgymnasium und legte dort im Jahre 1958 die Reifeprüfung ab. Nach einem Semester Maschinenbau an der TH Karlsruhe wurde ich im April 1959 zur Bundeswehr eingezogen, aber auf Grund einer Erkrankung vorzeitig entlassen.

Im November 1959 begann ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin mein Studium, das im Oktober 1964 mit dem Staatsexamen abgeschlossen wurde.

Meine Praktikantenzeit, die noch nicht beendet ist, habe ich zur Hälfte an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin absolviert.

